

ФГАОУ ВО «СЕВЕРНЫЙ (АРКТИЧЕСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ 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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н., доцент Косяков Д.С.

Архангельск – 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Характеристика лигнина и его структуры.....	12
1.1.1 Общие сведения о лигнине .....	12
1.1.2 Химическое строение лигнина и типы связей между его структурными фрагментами.....	13
1.1.3 Биосинтез лигнина в растениях.....	20
1.1.4 Выделение препаратов лигнина .....	21
1.2 Аналитические методы исследования лигнина .....	23
1.2.1 Спектральные методы .....	23
1.2.2 Двумерная спектроскопия ЯМР .....	25
1.2.3 Определение молекулярно-массовых характеристик лигнина .....	26
1.3 Масс-спектрометрические методы анализа лигнина .....	27
1.3.1 Газовая хроматография – масс-спектрометрия.....	27
1.3.2 Жидкостная хроматография – масс-спектрометрия.....	30
1.3.3 Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация.....	32
1.4 Применение масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа лигнинов и родственных соединений.....	34
1.4.1 Масс-анализаторы.....	35
1.4.2 Методы масс-спектрометрии с ионизацией лигнина при атмосферном давлении.....	38
1.4.3 Методы визуализации и математической обработки данных масс- спектрометрии высокого разрешения .....	45
Заключение к главе 1 .....	50
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	53
2.1 Оборудование .....	53
2.2 Материалы и реагенты .....	54
2.3 Модельные соединения лигнина .....	54
2.4 Препараты лигнина и их характеристика.....	56
2.5 Масс-спектрометрический анализ.....	58

2.6 Спектроскопия ЯМР .....	59
2.7 Определение молекулярных масс .....	60
2.8 Пиролитическая газовая хроматография/масс-спектрометрия .....	60
2.9 Элементный анализ.....	61
2.10 Нитробензольное окисление лигнина.....	61
<b>ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДА К АНАЛИЗУ ПРИРОДНЫХ ЛИГНИНОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ФОТОХИМИЧЕСКОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ .....</b>	<b>63</b>
3.1 Механизм фотоионизации лигнина .....	63
3.2 Влияние природы допанта на эффективность ионизации .....	66
3.3 Оптимизация параметров ионного источника .....	69
3.4 Оптимизация величины спектрального разрешения.....	73
3.5 Характеристика фрагментации модельных соединений .....	78
Заключение к главе 3 .....	87
<b>ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ЭКСПРЕССНОЙ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ СОСТАВА МОНОМЕРНЫХ ФРАГМЕНТОВ МАКРОМОЛЕКУЛ ЛИГНИНА МЕТОДОМ ДИССОЦИАЦИИ, АКТИВИРОВАННОЙ СОУДАРЕНИЯМИ .....</b>	<b>88</b>
4.1 Изучение активированной соударениями диссоциации модельных соединений лигнина .....	88
4.2 Определение относительного содержания сиригильных, гваяцильных и <i>n</i> -гидроксифенильных структурных единиц лигнина методом тандемной масс-спектрометрии с использованием широкополосной ДАС .....	92
Заключение к главе 4.....	98
<b>ГЛАВА 5. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИГНИНОВ КАК СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ .....</b>	<b>99</b>
5.1 Визуализация элементных составов лигнинных олигомеров методом ван Кревелена... ..	99
5.2 Классификация лигнинов на основе масс-спектров высокого разрешения с использованием метода анализа главных компонент.....	104
5.3 Установление элементных составов высокомолекулярных олигомеров лигнина в масс-спектрах методом Кендрика.....	108

5.3.1 Модификация одномерных графиков дефектов масс Кендрика для визуализации масс-спектров хвойного лигнина.....	109
5.3.2. Анализ олигомеров лигнина с применением модифицированных диаграмм Кендрика .....	114
Заключение к главе 5 .....	120
ГЛАВА 6. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ПРИРОДНЫХ ЛИГНИНОВ .....	121
6.1 Анализ лигнина крапивы .....	122
6.2 Характеристика структуры лигнина осоки .....	128
6.3 Молекулярный анализ лигнина флоэмы березы.....	135
Заключение к главе 6 .....	141
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	142
ВЫВОДЫ .....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	145

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- МСВР – масс-спектрометрия высокого разрешения;
- ФИАД – фотоионизация при атмосферном давлении;
- ЭРИ – электрораспылительная ионизация;
- ХИАД – химическая ионизация при атмосферном давлении;
- ВПМА – времяпролетный масс-анализатор;
- Orbitrap – орбитальная ионная ловушка.
- ФПЕ – фенилпропановая единица;
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс;
- ММР – молекулярно-массовое распределение;
- Пиро-ГХ/МС – пиролизическая газовая хроматография масс-спектрометрия;
- МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбционная ионизация;
- ИЦР ПФ – ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье;
- РСА – Principal component analysis, метод анализа главных компонент.
- ТГФ – тетрагидрофуран;
- МК – масса Кендрика;
- НМК – номинальная масса Кендрика;
- ДМК – дефект масс Кендрика;
- ГЭГГ –  $\beta$ -гваяциловый эфир гваяцилглицерина;
- СИЛР – секоизоларицирезинол;
- ДДДЭ – дигидродегидродиизоэвгенол;
- ПР – пинорезинол.

## ВВЕДЕНИЕ

**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, тиоацидолиз, 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 п-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 осоки.

**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), РФФИ (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.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Характеристика лигнина и его структуры

#### 1.1.1 Общие сведения о лигнине

Лигнин – сложный природный полимер, который формируется в клеточных стенках сосудистых растений, где выполняет перечень важнейших для жизни растений функций. Он отвечает за жёсткость и гидрофобность клеточных стенок растительных волокон и проводящих элементов растений, вызывает одревеснение клеток, обеспечивает устойчивость растения к атакам микроорганизмов и насекомых-вредителей [1,2]. За счет ковалентных связей лигнина с гемицеллюлозой и заполнения образующимся лигноуглеводным комплексом пространства между фибриллами целлюлозы образуется наноккомпозит с уникальными механическими свойствами, придающий растениям механическую прочность. Годовой прирост лигнина в растениях составляет порядка 150 млрд. т [3], что делает его вторым по распространенности биополимером в природе после целлюлозы.

Лигнин открыт в конце XIX в. А. Пайеном, в тот же период он был описан Ф. Шульце как корковый материал в древесине [4, 5]. Позже лигнин был описан как сложный трёхмерный нерегулярный ароматический полимер, состоящий из фенилпропановых структурных единиц [6]. Развитие аналитических методов позволило показать, что лигнин состоит из групп олигомеров с различными молекулярными структурами и функциональным составом, который зависит от происхождения растения, его биосинтеза и способа выделения [7].

В зависимости от типа растения содержание лигнина в нем будет варьироваться. Так, наибольшее количество лигнина содержится в древесине (20–30% в лиственных породах, 30–40% в хвойных), в то время как в травянистых растениях его содержание составляет порядка 10–15% [8,9].

Выделенные из древесины препараты малоизмененного (близкого к нативному) лигнина представляет собой аморфное нерастворимое в воде вещество от бежевого до темнокоричневого цвета, но растворимое в ряде органических растворителей (прежде всего высокоосновных апротонных). Известно, что макромолекулы лигнина состоят из фенилпропановых структурных единиц (ФПЕ)

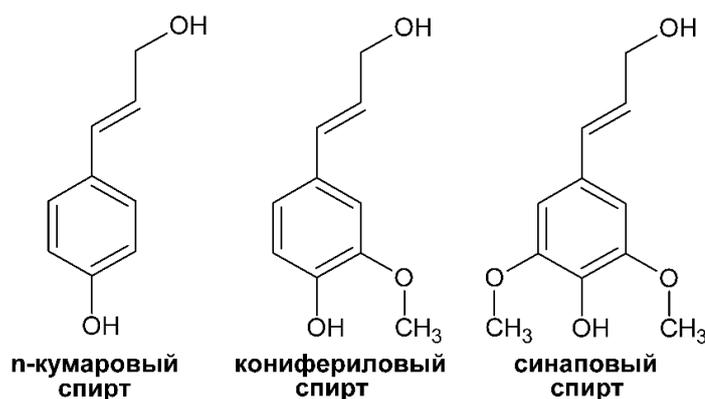
$C_6-C_3$  [7], соединённых друг с другом преимущественно  $\beta$ -O-4-эфирной связью [10]. Несмотря на то, что лигнин изучается довольно давно, до сих пор не существует единой точки зрения на его структуру и механизмы ее формирования.

Лигнин обладает высокой реакционной способностью за счёт наличия в структуре различных функциональных групп - фенольных и алифатических гидроксильных, карбоксильных и карбонильных. Такое разнообразие структуры позволяет получать из лигнина при его окислительной или восстановительной деструкции широкий круг ароматических соединений, наиболее важными из которых являются ванилин, сиреневый альдегид, *n*-гидроксibenзальдегид, пирокатехин, пирогаллол и фенол [11].

Не менее 50 млн. т технического лигнина образуется ежегодно в качестве побочного продукта в целлюлозно-бумажной промышленности, при этом 98-99 % от этого количества сжигается для производства энергии [12] и лишь 1-2 % находит практическое применение преимущественно в виде лигносульфонатов [13-15]. Применение лигнина в качестве источника ценных низкомолекулярных ароматических соединений до сих пор остается крайне ограниченным несмотря на высокую ценность потенциальных продуктов конверсии лигнина [12]. В связи с развитием «зеленых» технологий и тенденций к вовлечению в хозяйственный оборот возобновляемого сырья, исключительно важными являются задачи создания технологий эффективной валоризации лигнина [16-19]. Тем не менее, их разработка серьёзно сдерживается исключительной сложностью и лабильностью химического состава получаемых препаратов биополимера, и отсутствием надежных методов его изучения и контроля.

### 1.1.2 Химическое строение лигнина и типы связей между его структурными фрагментами

Как отмечено выше, с химической точки зрения лигнин является сложным полифункциональным полимером ароматической природы. Его структура образуется в ходе ферментативной дегидрогенизационной полимеризации трех монолигнолов – *n*-кумарового, кониферилового и синапового спиртов (рис. 1) [20].



**Рисунок 1.** Мономерные предшественники лигнина (монолигнолы)

Данные соединения являются предшественниками соответственно *p*-гидроксифенильных (H), гваяцильных (G) и сирингильных (S) мономерных структурных звеньев лигнина, соединённых между собой различными типами связей [21]. В зависимости от типа преобладающей базовой структурной единицы лигнины хвойных пород деревьев относят к гваяцильным, а лиственных – к гваяцил-сирингильным лигнинам. В небольших количествах в этих лигнинах содержатся *p*-гидроксифенильные мономерные звенья (табл. 1).

**Таблица 1.** Ориентировочный мономерный состав различных лигнинов [2]

	<b>H, %</b>	<b>G, %</b>	<b>S, %</b>
<b>Лигнин хвойных пород древесины</b>	4	95	1
<b>Лигнин лиственных пород древесины</b>	2	48	50
<b>Лигнин травянистых растений</b>	5	70	25

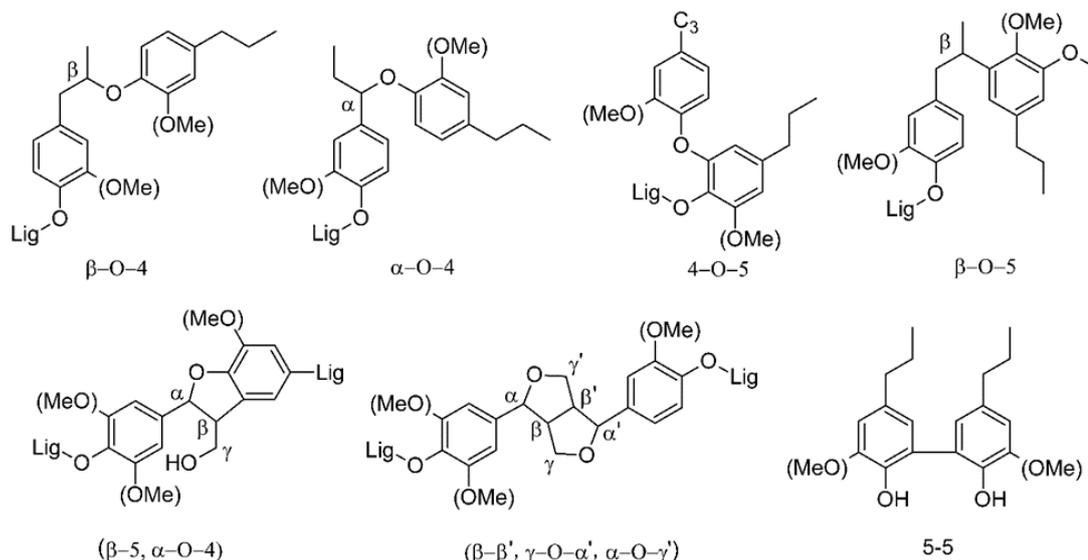
Представление химического строения лигнина в виде структурной формулы невозможно из-за того, что он не является индивидуальным веществом, а представляет собой смесь нерегулярных сополимеров. Поэтому можно лишь говорить о предположительных принципиальных схемах строения макромолекул и преобладающих типах связей между структурными единицами биополимера. К последним относятся простые эфирные связи с участием фенольных гидроксильных групп и  $\beta$ -углеродного атома пропановой цепи ( $\beta$ -O-4), в которые вовлечено более половины фенольных структур древесных лигнинов. Встречаются также алкил-арильные ( $\alpha$ -O-4), арил-арильные (4-O-5) и алкил-алкильные ( $\alpha$ -O- $\gamma$  и

$\gamma$ -O- $\gamma$ ) простые эфирные связи, алкил-алкильные ( $\beta$ - $\beta$ ), алкил-арильные ( $\beta$ -5) и диарильные (в основном 5-5) углерод-углеродные связи (табл. 2) [21].

**Таблица 2.** Ориентировочное содержание (%) основных типов связей между фенолпропановыми структурными единицами в лигнине [21]

Тип связи	Лигнин хвойной древесины	Лигнин лиственной древесины
$\beta$ -O-4	35-50	45-60
$\alpha$ -O-4	2-8	5-8
4-O-5	3,5-4	7-15
$\beta$ -5	9-12	4-6
5-5	10-23	2-9
$\beta$ - $\beta$	2-4	3-8
другие	13	5

Некоторые фенолпропановые единицы могут быть соединены одновременно двумя видами связей с образованием димерных фенолкумарановых ( $\beta$ -5,  $\alpha$ -O-4) или пинорезинольных ( $\beta$ - $\beta'$ ,  $\gamma$ -O- $\alpha'$ ,  $\alpha$ -O- $\gamma'$ ) структур (рис. 2) [22].



**Рисунок 2.** Основные типы связей и соответствующих димерных структур в макромолекуле лигнина

Лигнин в клеточной стенке очень тесно связан с углеводной частью. Он может проникать внутрь фибрилл целлюлозы и тем самым затруднять разделение лигнина и целлюлозы. Основная часть лигнина в виде аморфной массы вместе с

гемицеллюлозами находится между целлюлозными фибриллами, при этом кроме тесной механической связи между лигнином и гемицеллюлозами существуют и химические связи, прежде всего простые эфирные, образующиеся в  $\alpha$ -положении фенилпропановых структурных единиц за счет спиртовых гидроксильных групп гемицеллюлоз [23].

На данный момент предложено несколько моделей структуры макромолекул лигнина на основе экспериментальных данных, полученных в основном деградационными методами. В качестве классической рассматривается модель структуры елового лигнина предложенная Фрейденбергом (рис. 3) [24]. Для лиственных пород древесины наиболее известна структурная формула лигнина бука по Нимцу, представленная на рис. 4 [25].

Тем не менее, исследования последнего десятилетия, в том числе проводимые в России [26], демонстрируют наличие упорядоченности в топологической структуре макромолекул лигнина, которая может быть объяснена с позиций теории детерминированного хаоса, формирования в ходе хаотичных процессов лигнификации достаточно сложных диссипативных структур. Данные о гидродинамике макромолекул в растворах свидетельствуют о принципиальном различии в топологии макромолекул лигнинов, выделяемых из растений разных групп – для хвойных лигнинов характерна структура разветвлённых полимеров, лигнины лиственных деревьев относятся к звездообразным полимерам, а лигнины однолетних растений (например, злаков) обладают линейной структурой [27].

Такие выводы противоречат устоявшимся представлениям о наличии в тканях растений бесконечных трёхмерных сеток лигнина, являющихся своего рода каркасом для формирования лигноцеллюлозного композита. Формирование различных топологических структур может быть объяснено генетическим контролем биосинтеза определенных мономерных предшественников лигнина, отвечающих за ветвление макромолекул. К ним можно отнести, например, недавно открытые в лигнинах структуры дибензодиоксоцина [28], выступающие в качестве центров образования звездообразных макромолекул.

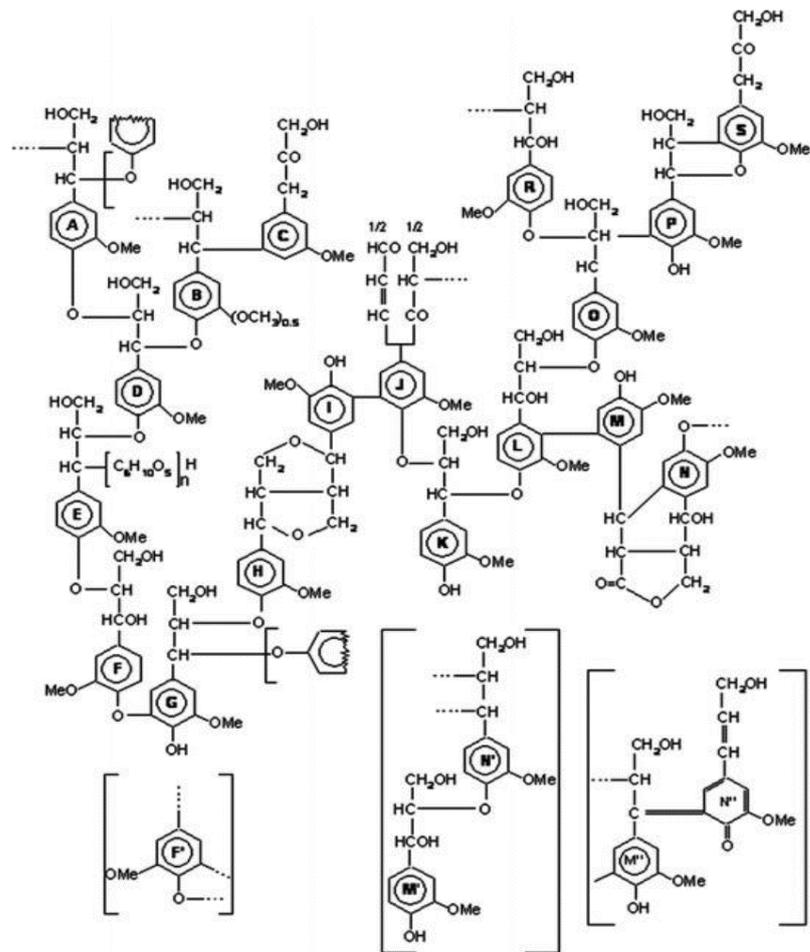


Рисунок 3. Структура лигнина ели по Фрейденбергу [24]

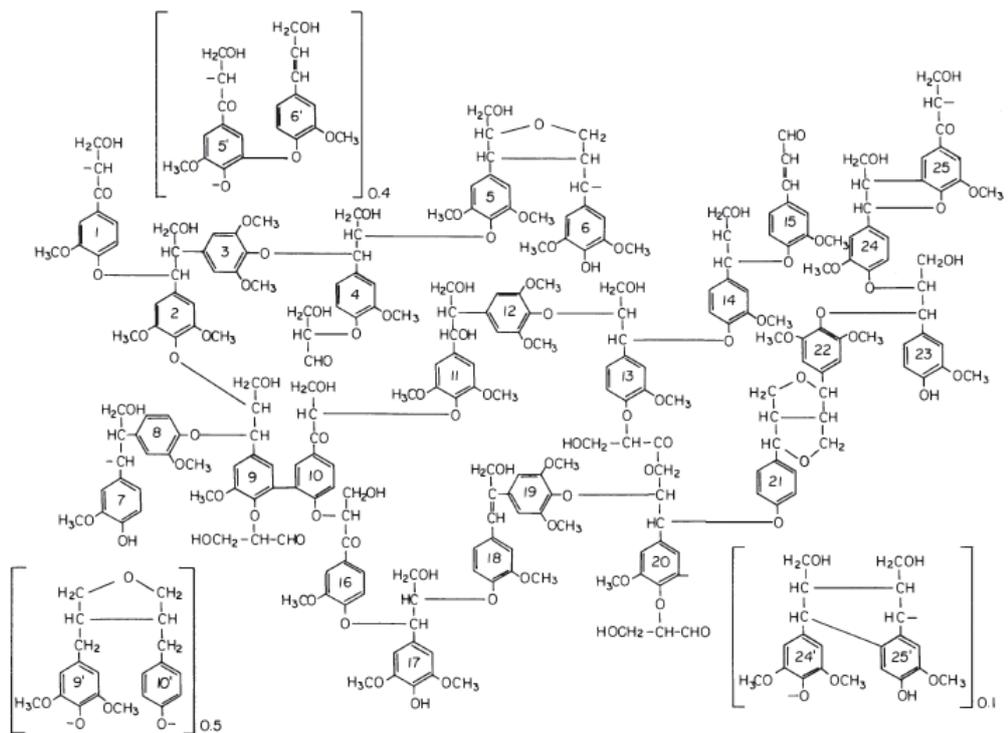
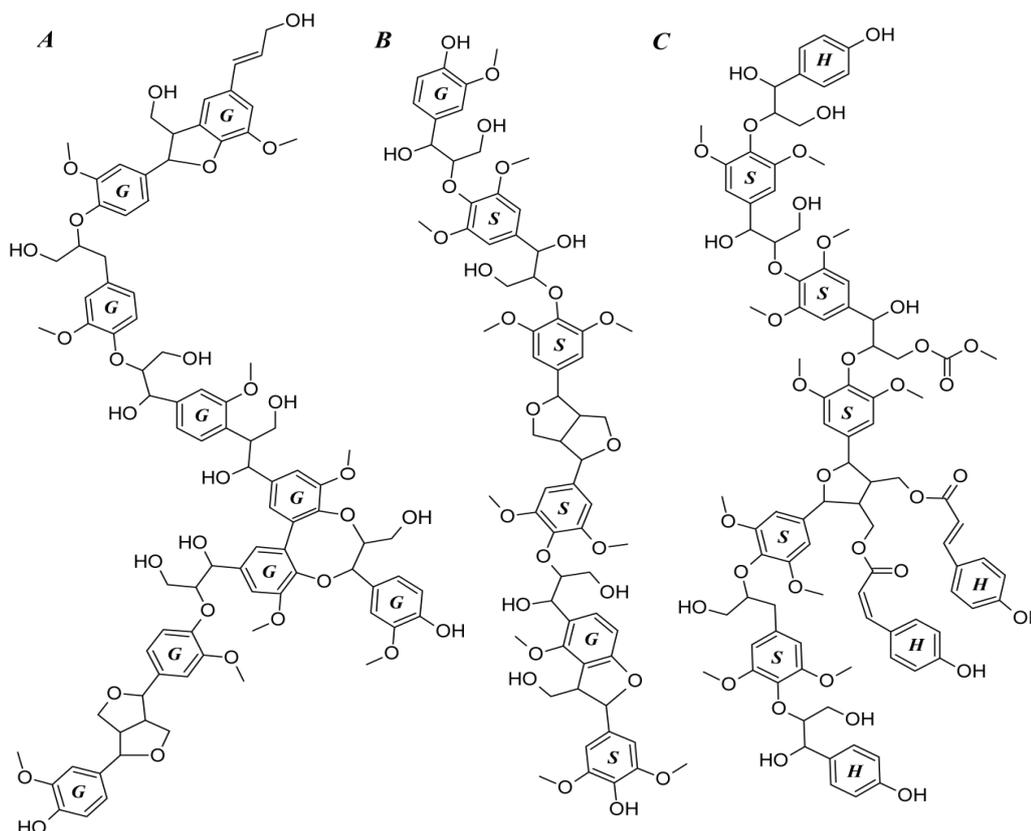


Рисунок 4. Структура лигнина бука по Нимцу [25]

Применение новых аналитических методов позволило углубить имеющиеся знания о традиционных и недавно обнаруженных структурных особенностях лигнина, в частности, использование двумерной спектроскопии ЯМР [29] позволило выделить новые структуры в лигнинах, включая дибензодиоксины [29] и спиродиеноны [29, 30]. Авторы работы [31] предложили следующие возможные структуры для трех типов лигнина, представленные на рисунке 5.



**Рисунок 5.** Модельные структуры лигнина для:  
А – хвойных пород; В – лиственных пород; С – травянистых растений [31]

Элементный состав лигнина не постоянен и зависит не только от вида растения, но и от метода выделения лигнина. Лигнин отличается от углеводов более высоким содержанием углерода (около 60%) по сравнению с полисахаридами (44,4% в целлюлозе), что обусловлено ароматической природой. Данные об элементном составе и содержании метоксильных групп лигнинов могут быть представлены в виде эмпирических формул. Например, формула лигнина хвойных пород древесины выглядит как  $C_9H_{8,3}O_{2,7}(OCH_3)_{0,97}$ , а для лиственных пород  $C_9H_{8,7}O_{2,9}(OCH_3)_{1,58}$  [32].

Одной из важнейших задач аналитической химии лигнина является точное и дифференцированное определение содержания всех функциональных групп в его составе, так как более точная информация о типах и количестве функциональных групп даёт возможность не только охарактеризовать свойства лигнина, но и предсказать реакционную способность биополимера в процессах переработки растительного сырья, а также модификации технических лигнинов с получением различных продуктов и материалов. Основными функциональными группами лигнина являются метоксильные ( $-\text{OCH}_3$ ), гидроксильные ( $-\text{OH}$ ), карбонильные ( $-\text{C}=\text{O}$ ) и карбоксильные ( $-\text{COOH}$ ) (табл. 3) [33].

**Таблица 3.** Типичный функциональный состав лигнина (число групп в расчете на 100 базовых фенилпропановых единиц)

<b>Функциональная группа</b>	<b>Хвойный лигнин</b>	<b>Лиственный лигнин</b>
Метоксильные группы	92-97	139-158
Фенольные гидроксильные группы	15-30	10-15
Спиртовые гидроксильные группы	30-40	40-50
Карбонильные группы	10-15	0

Метоксильные группы являются одними из наиболее характерных функциональных групп лигнина, по их количеству определяют «чистоту» препарата лигнина [33]. При этом содержание метоксильных групп в хвойном лигнине (15–17%) меньше, чем в лиственном (20–22 %).

Одним из основных путей связывания ФПЕ в лигнине является образование простых эфирных связей за счёт наличия гидроксильных групп в лигнине. Они разделяются на алифатические (спиртовые), находящиеся в пропановой цепи, и фенольные, связанные с бензольным кольцом [23]. Для разных лигнинов в среднем содержание гидроксильных групп составляет 9–11 % [7].

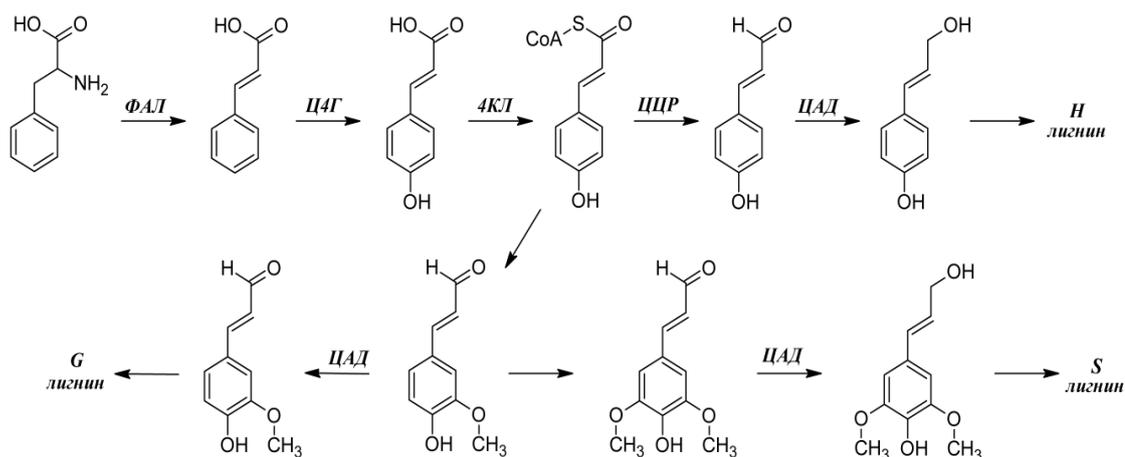
Карбонильные группы лигнина могут быть как кетонными, так и альдегидными. Кетонные группы находятся в  $\alpha$ - и  $\beta$ -положениях пропановой цепи. Альдегидные группы находятся в  $\gamma$ -положении в концевых фенилпропановых единицах.

Карбоксильные группы в природном лигнине и его препаратах, близких к природному лигнину, присутствуют в весьма малых количествах (порядка 0,05 %),

но в технических лигнинах, а также некоторых других препаратах, их доля возрастает. В природном лигнине они присутствуют в алифатических структурах, т. е. находятся в  $\gamma$ -положении пропановой цепи. Среди продуктов окислительных превращений лигнина могут появляться ароматические карбоновые кислоты [34].

### 1.1.3 Биосинтез лигнина в растениях

Хотя исследователи изучали лигнин более века, многие аспекты его биосинтеза остаются нерешёнными. Механизм биосинтеза монолигнолов многократно пересматривался и остаётся предметом дискуссий [35, 36]. Аналогичным образом, биохимические процессы, приводящие к дегидрированию монолигнолов в клеточной стенке, их полимеризации и накоплению, являются предметом активного обсуждения [37-39]. В основном лигнин образуется во вторичной клеточной стенке, что делает её жёсткой и непроницаемой. Его биосинтез также может быть индуцирован при различных условиях биотического и абиотического воздействия, например, таких как ранение, патогенная инфекция, метаболический стресс и нарушения в структуре клеточной стенки [40]. Основными строительными блоками лигнина являются гидроксикоричные спирты (или монолигнолы): кониферилловый спирт и синапилловый спирт, а также небольшое количество *n*-кумарового спирта. Монолигнолы синтезируются через общие фенилпропаноидные и монолигнол-специфические пути (рис. 6) [40].



**Рисунок 6.** Основные пути биосинтеза лигнина [41]

(ФАЛ – фенилаланин аммония лиаза; Ц4Г – циннамат-4-гидроксилаза; 4КЛ – 4-кумарат-СоА лиаза; ЦАД – циннамил алкогольдегидрогеназа; ЦЦР – циннамил-СоА редуктаза)

Помимо различий в количестве лигнина среди таксонов и видов растений, состав лигнина также может различаться у разных типов клеток [42]. Лигнины могут также отличаться на уровне отдельных слоёв клеточной стенки, как показано с помощью рамановской, ИК- и УФ-спектроскопии [43, 44]. Общепринято считать, что лигнин образовался вместе с переходом растений на сушу, тем самым предоставив им структурную поддержку необходимую для правильного роста. Сравнительные исследования геномики, основанные на доступных геномах растений, показывают, что полный путь биосинтеза лигнина впервые появился во мхах [45], но отсутствовал у зелёных водорослей. Тем не менее, недавние исследования также обнаружили вторичные стенки и лигнин в составе морской красной водоросли *Calliarthron*, которая развивалась более 1 млрд. лет назад [46], что указывает либо на очень сильно консервативную эволюционную историю или конвергентную эволюцию. В поддержку последней гипотезы параллели между *Calliarthron* и покрытосеменными очевидны: лигнин во вторичных клеточных стенках *Calliarthron* мог эволюционировать, чтобы противостоять изгибающим напряжениям, создаваемым волнами. У видов ликофитов *Selaginella* конвергентная эволюция была продемонстрирована с идентификацией биосинтеза S-лигнина, обнаруженного у покрытосеменных растений [47]. Считается, что путь S-лигнина в голосеменных отсутствует [48]. Однако сложная эволюционная загадка относительно биосинтеза лигнина все ещё не решена окончательно.

#### 1.1.4 Выделение препаратов лигнина

Этапу выделения лигнинов из растительного сырья обычно предшествуют измельчение материала и удаление из него экстрактивных веществ различными органическими растворителями или их смесью [49].

Существуют различные методы выделения лигнина, но ни один из них не позволяет выделить препарат, полностью идентичный природному лигнину [25]. Это связано с тем, что лигнин в клеточной стенке растения находится не только в свободном состоянии, но и связан с полисахаридами, что затрудняет получение чистого препарата. Кроме того, при извлечении лигнина протекают конкурирующие реакции конденсации. Реагенты и растворители, применяемые для получения препаратов, также дают побочные реакции [25].

Все методы выделения лигнина можно разделить на две группы: выделение лигнина в виде нерастворимого остатка путем удаления из образца целлюлозы, гемицеллюлоз и других компонентов и выделение лигнина путем перевода его в раствор с последующим осаждением.

При выделении лигнина из древесины с целью исследования его структуры и свойств важнейшую роль играют методы, позволяющие получать малоизмененный лигнин, наиболее близкий к природному (протолигнину). В таких методах лигнин не извлекается полностью, но максимально сохраняет свою структуру. Лигнин Бьеркмана или лигнин механического размола в настоящее время считают наиболее близким к природному препарату лигнина. Его извлекают из древесины нейтральными растворителями в отсутствие кислотных катализаторов после длительного (до нескольких недель) размола в шаровых мельницах, приводящего к глубокому разрушению растительного материала и разрыву части связей лигнина с полисахаридами [25]. Другой подход к выделению малоизмененных лигнинов основан на ферментативных реакциях, способствующих гидролизу полисахаридной составляющей растительного сырья. Лигнин в этом случае остаётся в виде негидролизуемого остатка. Такой метод даёт высокий выход, но при этом сохраняется значительная доля углеводов, связанных со структурными фрагментами лигнина [50]. Данный недостаток в значительной мере характерен и для лигнина Бьеркмана.

Методы получения органосольвентных лигнинов основаны на обработке древесных опилок органическими растворителями (этанол, диоксан, метанол, ДМСО) в присутствии небольшого количества воды и кислотного катализатора, обычно HCl. Выход таких лигнинов значительно меньше количества природного лигнина в древесине, что обусловлено неполным переходом его в раствор, реакциями конденсации и потерей в виде водорастворимых низкомолекулярных продуктов [23]. Из этой группы препаратов лигнина наиболее близок к природному – диоксанлигнин, выделяемый по методу Пеппера с применением в качестве растворителя смеси диоксан - вода (9:1) в присутствии 0,5 % HCl. Благодаря простоте выделения и отсутствия значительных примесей полисахаридов, диоксанлигнин наиболее широко используется для исследования свойств лигнинов

и рассматривается как препарат, максимально отражающий химические и структурные особенности протолигнина [51].

\* \* \*

Таким образом, лигнин в настоящее время является одним из наиболее перспективных возобновляемых ресурсов биологического происхождения для производства биотоплива, полимерных материалов, сорбентов и антиоксидантных препаратов. Огромный потенциал также может быть реализован в процессах его конверсии в низкомолекулярные ценные ароматические соединения. Однако, использование лигнина сдерживается лабильностью его химического состава и структуры, а также многообразием входящих в состав макромолекул биополимера структурных фрагментов, обуславливающих исключительную сложность молекулярного состава препаратов лигнина. Необходимость лучше охарактеризовать и понять этот сложный биополимер привела к развитию широкого спектра аналитических подходов, направленных как на установление функционального состава лигнина или его молекулярно-массовых характеристик, так и на более глубокий анализ молекулярного состава полимера.

## **1.2 Аналитические методы исследования лигнина**

### **1.2.1 Спектральные методы**

При исследовании функционального состава лигнинов в настоящее время наиболее широко используются спектральные методы: ИК-, дифференциальная (разностная) УФ-спектроскопия и одномерная спектроскопия ЯМР. Главным их преимуществом является то, что они относятся к неdestructивным методам исследования [52].

С помощью ИК-спектроскопии можно определить наличие в лигнине ароматических колец, гидроксильных, карбонильных и метоксильных групп. Область спектра от  $1800$  до  $700\text{ см}^{-1}$ , известная как область «отпечатков пальцев», хорошо подходит для идентификации соединений, в том числе и таких сложных, как лигнины, и их классификации [53]. Это универсальный, высокопроизводительный метод, показывающий высокую чувствительность и селективность, который не требует большого количества исследуемого образца и

много времени для его подготовки [54]. Однако из-за сложности строения лигнина многие полосы на ИК-спектрах перекрываются, что затрудняет процесс их интерпретации. ИК-спектроскопию можно использовать и для полуколичественной характеристики функционального состава лигнинов по изменению интенсивностей полос поглощения. Для этого в качестве внутреннего стандарта используют полосы поглощения скелетных колебаний ароматических колец при 1510 и 1600  $\text{см}^{-1}$  [55].

Для количественной оценки содержания фенольных гидроксильных групп часто применяют метод спектрофотометрии в УФ-области [56, 57], который отличается простотой и дешевизной анализа. Метод основан на обнаружении того, что фенольные группы в неионизированной (т.е. в нейтральной среде) и ионизированной (т.е. в щелочной среде) формах различаются по электронным спектрам поглощения. Эта разница может быть использована для оценки соотношения различных фенольных групп [58].

В настоящее время для функционального анализа лигнинов всё чаще применяют метод спектроскопии ЯМР. Так, получение спектров на ядрах  $^{31}\text{P}$  позволяет количественно определить различные типы гидроксильных групп (алифатические, фенольные с дифференцированием структур S, G и H типов), а также карбоксильные группы. Метод основан на предварительном фосфитилировании образца за счет взаимодействия ОН-групп с 2-хлор-4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-диоксафосфоланом [59]. Спектроскопия ЯМР на ядрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  также находит широкое применение для определения содержания различных структурных фрагментов в расчете на одну фенилпропановую структурную единицу. В настоящее время существуют обширные базы данных по химическим сдвигам для модельных соединений лигнина, которые основываются на  $^1\text{H}$  спектроскопии ЯМР [60]. Метод спектроскопии ЯМР на ядрах  $^{13}\text{C}$  позволяет выявить большое количество функциональных групп лигнина, таких как гидроксильные, метоксильные, карбонильные. В отличие от  $^1\text{H}$  ЯМР,  $^{13}\text{C}$  ЯМР имеет более высокую разрешающую способность за счет более широкого диапазона химического сдвига.

### 1.2.2 Двумерная спектроскопия ЯМР

Внедрение в аналитическую практику техники двумерной спектроскопии ЯМР позволило поднять на новый уровень имеющиеся знания о строении лигнина. Авторы работ [61, 62] показали, что сочетание количественного одномерной спектроскопии ЯМР на ядрах  $^{13}\text{C}$  и двумерной (преимущественно в варианте HSQC) спектроскопии ЯМР дает надежные данные, пригодные для идентификации и количественной оценки связей и компонентов в лигнинах различной природы и лигноуглеводном комплексе, открыты новые структурные фрагменты макромолекулы лигнина – дибензодиоксоцин и спиродиенон [63]. В настоящее время активно развивается направление, связанное с количественным определением различных структур в лигнинах методом двумерной спектроскопии ЯМР [64] и применением разработанных подходов к характеристике лигнинов различных растений [65].

Наибольшее количество структурной информации накоплено для лигнинов древесного происхождения, в то время как лигнины травянистых растений до сих пор изучены слабо. Большинство описанных в литературе исследований по данной тематике относятся к лигнинам злаковых растений как компоненту крупнотоннажных отходов сельского хозяйства [66]. Установлено, что основными типами связей между структурными фрагментами лигнина пшеничной соломы являются преимущественно  $\beta$ -O-4 (75%), а также фенилкумарановые группировки (11%) [67]. Применение метода двумерной спектроскопии ЯМР позволило установить общие закономерности химического строения лигнинов растений родиолы розовой и серпухи венценосной [68], показано, что изучаемые лигнины построены из гваяцильных, сирингильных и *n*-кумаровых фрагментов, соединённых преимущественно  $\beta$ -O-4-связями. Известным отличием лигнинов травянистых растений является возможность ацетилирования части гидроксильных групп [69], а также наличие значительного количества ковалентных связей с углеводными остатками и флавоноидами [70]. Ещё одной важнейшей особенностью является наличие в структуре макромолекул остатков гидроксикоричных кислот, содержание которых может достигать 20% [71]. Последние могут быть вовлечены в образование  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 связей с фенилпропановыми звеньями, а также сложных эфиров с углеводами [72, 73, 74].

Метод двумерной спектроскопии ЯМР несомненно является мощным аналитическим инструментом для изучения строения лигнина, однако, данный метод не лишён и недостатков, связанных в первую очередь с высокой стоимостью оборудования, продолжительностью анализа, низкой чувствительностью. Также получаемые данные позволяют судить лишь в целом о препарате лигнина, не позволяя проводить характеризацию химического состава на молекулярном уровне и структурные исследования отдельных олигомеров.

### 1.2.3 Определение молекулярно-массовых характеристик лигнина

Наряду с изучением функционального состава и структуры лигнинов, важным элементом характеристики биополимера подразумевается и определение его молекулярно-массовых характеристик [75, 76], что является непростой задачей вследствие сложного строения и разнообразия препаратов лигнина [77], молекулярные массы которых могут варьироваться от нескольких сотен Да до сотен тысяч Да [78]. Для определения молекулярно-массовых характеристик лигнина используют методы эксклюзионной хроматографии, вискозиметрии, светорассеяния, ультрацентрифугирования и другие [79]. Самый распространённый из них – эксклюзионная хроматография. Для определения молекулярных масс лигнинов в качестве подвижных фаз используют раствор гидроксида натрия, тетрагидрофуран, диметилформамид [80]. Выбор состава подвижной фазы определяется необходимостью элиминирования нежелательных взаимодействий полимера с неподвижными фазами. В качестве последних используются гели на основе гидроксированного метакрилата [81], сульфированного стирол-дивинилбензольного сополимера [82] или сшитого стирол-дивинилбензольного сополимера [83]. Детектирование чаще всего производят с помощью спектрофотометрического детектора с длиной волны от 250 до 290 нм [84]. При использовании в качестве элюентов органических растворителей необходимо учитывать влияние полиэлектролитных эффектов, подавление которых достигается добавкой в подвижную фазу солей, например бромид лития.

### 1.3 Масс-спектрометрические методы анализа лигнина

В отличие от упомянутых выше спектральных методов, масс-спектрометрия дает возможности для характеристики биополимера на молекулярном уровне и обладает такими преимуществами как экспрессность анализа, специфичность и высокая чувствительность. Данный метод уже хорошо зарекомендовал себя в анализе нефти, природного органического вещества и других сложных по составу объектов, при этом лег в основу целого ряда соответствующих научных направлений или так называемых омиксных наук – гуминомики, петролеомики, липидомики и пр. Масс-спектрометрия лигнина, дающая начало новой отрасли науки – лигномики – является достаточно молодым научным направлением, которое начало бурно развиваться в последние 10-15 лет и в настоящее время набирает обороты в связи с особенным вниманием к возобновляемым природным ресурсам. Масс-спектрометрические методы исследования лигнина могут использоваться как в сочетании с хроматографическими методами разделения (преимущественно для исследования низкомолекулярных лигнинных веществ), так и для непосредственного анализа интактного биополимера (например, в варианте масс-спектрометрии МАЛДИ) и изучения его полимолекулярных свойств.

#### 1.3.1 Газовая хроматография – масс-спектрометрия

Первые исследования лигнина с применением газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием были затруднены сложностью идентификации компонентов из-за отсутствия сопоставимых спектров в литературе. Одна из первых работ была посвящена анализу мономеров, димеров и тримеров лигнина в жидких ароматизаторах дыма [85]. Используя ионизацию электронами, ее авторы смогли идентифицировать несколько мономерных соединений (фенол, гваякол и производные сирингола), а также их алкил-арилловые эфиры, сравнивая их результаты с базами данных. Идентификация димерных и тримерных структур не была выполнена вследствие недоступности библиотечных масс-спектров соответствующих соединений.

Как правило, ГХ-МС используется для анализа лигнина с применением методов его предварительной деградации, а также дериватизации образующихся низкомолекулярных соединений [86-88]. Одним из наиболее часто используемых

способов деполимеризации лигнина является тиацидолиз, который нашел свое применение в работах по анализу лигнина компрессионной древесины [89], нахождению различий в структуре полимера между первичной и вторичной клеточной стенками древесины [90], а также для обнаружения в лигнине травянистых растений трицина, инкорпорированного в структуру биополимера [91]. В качестве альтернативы тиацидолизу Лу и Ральф [92] разработали новый подход, основанный на дериватизации с последующим восстановительным расщеплением, для достижения более простой и селективной деградации простых эфирных связей в структуре полимера. Данный метод активно применялся для изучения лигнинов в хвойной и лиственной древесине, травянистых растениях [93], пищевых волокнах во фруктах и овощах [94].

Сочетание пиролитической газовой хроматографии и масс-спектрометрии (Пиро-ГХ/МС) чаще всего используется для определения химического состава лигнинов в древесине [95]. Метод позволяет идентифицировать различные структурные единицы лигнина, которые образуются в виде смеси простых фенолов в результате расщепления эфирных и углерод-углеродных связей в макромолекуле [96]. Основными достоинствами метода являются простота пробоподготовки, малое (~0,1 мг) количество исследуемого образца. Недостатком пиролитической деградации лигнина с точки зрения анализа химического состава биополимера является существенная потеря термолабильных структур, в частности, содержащих в своём составе карбоксильные группы. Одной из таких групп соединений являются гидроксикоричные кислоты в травянистых растениях, которые вовлечены в образование  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 связей с фенилпропановыми звеньями, а также сложных эфиров с углеводами [79, 96]. Решение данной проблемы было представлено в работе [73], где пиролиз полимеров осуществляли в присутствии гидроксида тетраметиламмония (ГТМА). Данная техника была применена для анализа гуминовых веществ и лигнинов [97, 98], что позволило получить более полную информацию о продуктах пиролиза. Авторы работы [99] применяли пиролитическую ГХ-МС в присутствии ГТМА для определения соотношения S/G в лигнинах гибискуса и бука. Результаты показали, что пиролиз с ТМА является эффективным инструментом для получения S/G соотношений для лигнинов и хорошо согласуется с данными, определенными тиацидолизом. Однако пиролиз с

ТМА имеет существенный недостаток в структурных исследованиях деградированных лигнинов, которые подверглись процессам частичного деметилирования, что в последствии осложняет идентификацию образующихся метилированных производных. Для решения такой проблемы авторы работы [100] предложили использовать технику пиролиза в присутствии гидроксида тетрабутиламмония (ГТБА) с образованием соответственно бутильных производных коричных кислот.

Учитывая имеющиеся недостатки применения Пиро-ГХ-МС относительно лигнина, группа исследователей [101] предложила сочетание методов термогравиметрического анализа и десорбционной ГХ-МС. Образцы лигнина подвергались пиролизу в диапазоне температур от 30 °С до 600 °С с низкой скоростью нагрева в атмосфере аргона с термогравиметрическим анализатором. Образующиеся летучие вещества захватывались с помощью трубки из нержавеющей стали и накапливались на полимерном сорбенте. Затем они были выпущены в автономном режиме через систему термодесорбции в систему ГХ-МС, по результатам анализа которой удалось идентифицировать 26 ароматических соединений. Расширить круг образующихся продуктов удалось в работе [102] с применением катализаторов. В работе [103] впервые было продемонстрировано сочетание термогравиметрии с фотоионизационной масс-спектрометрией, позволившее выявить существенные различия в компонентном составе продуктов пиролиза крафт-лигнина (преобладающими соединениями были пирокатехин, гваякол и метилгваякол) и лигнита – низкосортного угля, схожего по своей природе с лигнином (преобладающими продуктами были фенолы и алкилфенолы, например, крезол). В работе [104] масс-спектрометрия продуктов пиролиза использовалась для получения информации о химическом составе коры из широколиственных пород деревьев, что позволило получить важную информацию о ее составляющих, в том числе лигнине.

Одной из последних работ, посвящённых определению относительного содержания структурных единиц в лигнине, является работа [105], в которой коллектив авторов впервые предложил подход, основанный на предварительном пиролизе лигнина в ионном источнике масс-спектрометра с последующим депротонированием продуктов пиролиза с помощью химической ионизации при

атмосферном давлении в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов. Коллектив авторов отмечает высокую экспрессность анализа (3 минуты на пробу) и простоту обработки результатов, так как оценку содержания мономерных единиц лигнина проводили с учетом всего 9 образующихся ионов. Однако, данный подход был апробирован лишь на одном типе лигнина (лигнине тополя), что требует дальнейших исследований на более широком круге различных лигнинов.

### 1.3.2 Жидкостная хроматография – масс-спектрометрия

Учитывая наличие в составе лигнина термолабильных соединений, а также необходимости проведения трудоёмкой пробоподготовки, в качестве альтернативы газохроматографическому разделению при анализе низкомолекулярных лигнинных веществ выступают методы высокоэффективной жидкостной хроматографии, не требующие предварительной дериватизации аналитов. Мягкие условия разделения и ионизации в ВЭЖХ-МС позволяют анализировать гораздо более крупные интактные олигомеры лигнина [106]. Так, в работе [107] представлен простой способ определения соотношения S/G-единиц лигнина в растениях (эвкалипт), после предварительной процедуры щелочного гидролиза (95 °С в течение 24 ч) с последующей нейтрализацией кислотой и экстракцией продуктов этилацетатом. Были идентифицированы три монолигнола (4-гидроксибензальдегид (H), ванилин (G) и сиреневый альдегид (S)) и другие продукты гидролиза. Сравнение полученных данных соотношения S / G для эвкалипта с методом Пиро-ГХ-МС показало близкие по своим значениям результаты (3,49 против  $3,87 \pm 0,17$ ). В другом исследовании для деполимеризации лигнина применялось щелочное нитробензольное окисление для последующего хроматографического разделения образующихся продуктов с целью определения мономеров лигнина в пшеничной соломе [108]. Образец пшеничной соломы был окислен указанным выше способом с получением 4-гидроксибензальдегида, ванилина и сиреневого альдегида, которые определялись методом ВЭЖХ-МС/МС в режиме мониторинга заданных реакций.

Метод ВЭЖХ-МС применялся не только для оценки соотношений структурных единиц в лигнине, но и для глубокой характеристики всего олигомерного состава лигнина, который представляет собой сложную смесь, содержащую большое количество различных компонентов. В литературе известно

несколько попыток разработки ВЭЖХ методик для максимально эффективного разделения большого количества мономеров и олигомеров лигнина. Одним из таких примеров является использование сверхкритической флюидной хроматографии [109], использующей в качестве подвижной фазы  $\text{CO}_2$ . В работе [110] использовалось сопряжение МС низкого разрешения с противоточной распределительной хроматографией для изучения образцов биомассы водных растений. При помощи данного метода удалось фракционировать, а далее, применяя технику двумерной хроматографии, масс-спектрометрически (ионизация электрораспылением с регистрацией положительно и отрицательно заряженных ионов) определить в составе биомассы углеводы, фураны, карбоновые кислоты и фенолы (всего около 220 индивидуальных соединений).

Применение методов ВЭЖХ с тандемной масс-спектрометрией значительно облегчают идентификацию сложной смеси компонентов с помощью известных путей фрагментации или при сравнении с существующей литературой или базами данных. Так, в работе [111] на основе тандемных масс-спектров олигомеров синтетического лигнина были продемонстрированы основные пути его фрагментации, включающие потерю метильной группы (15 Да),  $\text{CO}$  (28 Да) или молекулы воды (18 Да).

Большое количество работ посвящено изучению процессов фрагментации отдельных структурных фрагментов макромолекул лигнина. Например, Амундсон с соавторами [112] использовали ионизацию электрораспылением с последующей диссоциацией, индуцированной соударениями, для отслеживания количества функциональных групп в ароматических звеньях. Авторы изучили фрагментацию 40 аналитов путем проведения многостадийной фрагментации (до  $\text{MS}^5$ ) с использованием линейной ионной ловушки. Они смогли идентифицировать и различные кислородсодержащие функциональные группы. Это доказало применимость анализа  $\text{MS}^n$  высоких порядков для улучшения понимания состава низкомолекулярных родственных лигнину соединений. В последующих исследованиях [113] рассматривались спектры 34 продуктов деградации лигнина, полученные в результате диссоциации, активированной соударениями. Закономерности фрагментации позволили чётко различать положение карбоксильных, альдегидных, фенольных групп, а также простых эфирных связей.

Применение этих знаний к органосольвентным лигнинам позволило выявить присутствие специфических функциональных групп и их комбинаций в структуре изучаемых препаратов с помощью ВЭЖХ-МС<sup>n</sup>.

Таким образом, применение хроматографических методов разделения в сочетании с масс-спектрометрическим анализом позволило успешно изучать сложные смеси низкомолекулярных лигнинных веществ и продуктов деполимеризации лигнина, однако не обеспечило возможности характеристики препаратов лигнина, содержащих исключительно широкий круг олигомеров в большом диапазоне молекулярных масс.

### 1.3.3 Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

Масс-спектрометрия МАЛДИ в настоящее время является одним из наиболее важных методов для изучения биополимеров благодаря таким преимуществам, как условия мягкой ионизации, исключительно широкий рабочий диапазон молекулярных масс, простота и скорость приготовления образцов.

Масс-спектрометрия МАЛДИ способна ионизировать и детектировать интактные молекулы олигомеров лигнина в диапазоне от тримеров (~600 Да) до нонамеров (~1800 Да) [114]. Важным достоинством МАЛДИ МС является возможность картирования образцов с изучением пространственного распределения лигнинных веществ. Наиболее часто МАЛДИ МС реализуется на основе времяпролетных масс-анализаторов и позволяет получить также информацию о средней молекулярной массе, типе и количестве повторяющихся структурных единиц в лигнинных олигомерах [115].

В работе [116] МАЛДИ МС использовалась для изучения пространственного распределения лигнина в тканях двух видов эвкалипта. Поскольку традиционные матрицы оказались неэффективными для получения масс-спектров непосредственно с поверхности растительного материала, авторы предложили применение микрочастиц силикагеля, наносимых на срезы древесины в качестве альтернативной матрицы. Идентификация олигомеров производилась путем сравнения с библиотекой МС/МС данных. Исследователи смогли выделить 22 из 24 соединения в этой библиотеке, представляющие основные растворимые мономеры и низкомолекулярные олигомеры лигнина.

Ранее нашим коллективом [117] достигнуты значительные успехи в оптимизации методов МАЛДИ лигнина и выборе условий ионизации биополимера. Проведено сравнение эффективности шести кристаллических матриц, широко используемых для анализа полимеров, а также изучено влияние способа нанесения матрицы и образца на мишень МАЛДИ. Показано, что наилучшие результаты могут быть достигнуты при использовании в качестве матрицы феруловой кислоты при нанесении ее между слоями лигнина. Наиболее впечатляющие результаты достигнуты при использовании в качестве матриц ионных жидкостей [118]. Синтезировано 32 ионных жидкости на основе азотсодержащих органических катионов и анионов ароматических кислот, многие из которых показали высокую эффективность для МАЛДИ лигнина и позволили получать высококачественные масс-спектры в рекордно широком диапазоне молекулярных масс и впервые получать тандемные масс-спектры лигнинных олигомеров, в том числе с массами более 2 кДа.

Научная группа под руководством проф. Фольмера также проводила исследования по применению МАЛДИ МС с различными матрицами для получения масс-спектров лигнинных веществ – низкомолекулярных продуктов глубокой электрохимической деградации лигнина, полученных в различных условиях [119]. Выбор матрицы оказал значительное влияние на селективность (особенно для серо- и азотсодержащих продуктов) и эффективность ионизации. Исследование наглядно продемонстрировало, что даже для родственных друг другу лигнинных веществ требуется применение различных матриц.

Бану (Banoub) с соавт. добились значительного прогресса в использовании метода МАЛДИ-МС/МС для изучения лигнинов. В обзорной статье [120] на основе данных, полученных с использованием комплекса масс-спектрометрических методов ими сделан ряд новых предположений о структуре лигнинов. В частности, было предложено рассматривать нативные лигнины как набор линейных олигомеров разной длины, которые в растительной ткани поперечно связаны с целлюлозой и гемицеллюлозой. Они также предположили, что достижение более точного структурного определения для лигнина в нативной форме требует анализа так называемого первично высвобожденного лигнина, который не подвергался очистке или химическому преобразованию, кроме кислотного гидролиза и/или

ферментативного гидролиза для высвобождения его из лигноуглеводного комплекса. Возможность применения МАЛДИ для структурных исследований лигнина показана в работе [121], посвященной анализу лигнина финиковой пальмы. Для установления структур отдельных ионов авторы работы использовали диссоциацию, активируемую соударениями. Однако, представленные гипотетические структуры олигомеров вызывают серьезные вопросы с точки зрения химии лигнина и корректности интерпретации масс-спектрометрических данных, характеризующихся низким спектральным разрешением.

Несмотря на все достоинства МАЛДИ, данный метод в настоящее время не может рассматриваться в качестве приоритетного для структурных исследований лигнина в силу ряда причин, важнейшей из которых является низкая эффективность ионизации биополимера при использовании классических матриц, матричные интерференции, а также недостаточно высокое разрешение и точность определяемых масс, не позволяющие получать брутто-формулы лигнинных олигомеров [117, 122].

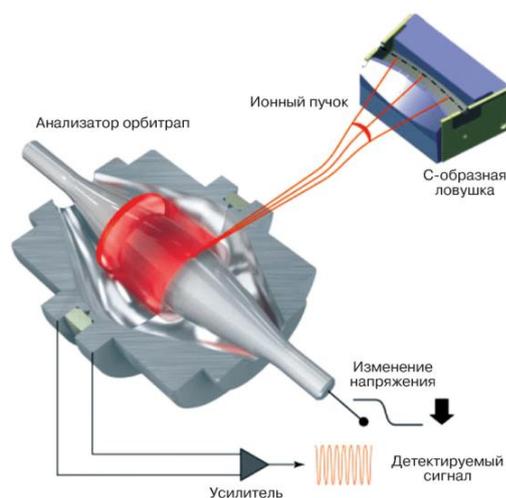
#### **1.4 Применение масс-спектрометрии высокого разрешения для анализа лигнинов и родственных соединений**

Несмотря на значительный прогресс в применении масс-спектрометрических методов для анализа лигнинов, дальнейшее их развитие должно быть направлено в сторону применения масс-анализаторов высокого и сверхвысокого разрешения [123, 124]. Такая необходимость связана с наличием в лигнинах большого количества изобарных соединений с одинаковыми номинальными массами, а также открывающимися возможностями максимально полной характеристики химического состава лигнинов на молекулярном уровне за счет определения элементных составов всех детектируемых олигомеров. С другой стороны, получение высокоинформативных масс-спектров высокого разрешения позволяет эффективно использовать множество современных подходов к анализу получаемых данных, переходя к изучению «лигнома».

### 1.4.1 Масс-анализаторы

Для исследования лигнина методом масс-спектрометрии высокого разрешения применялись техники на основе времяпролетных масс-анализаторов (ВПМА), ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (ИЦР), а также орбитальной ионной ловушки с Фурье-преобразованием (Orbitrap), что наиболее полно отражено в недавнем обзоре Летурно и Фольмера [125]. Несомненным преимуществом ВПМА является высокая скорость сканирования спектра (порядка 100 Hz), однако данный тип масс-анализаторов сильно уступает ИЦР ПФ и Orbitrap в разрешающей способности. Применение ИЦР требует значительных капитальных затрат и дорогостоящего обслуживания оборудования, но обеспечивает максимальное спектральное разрешение на уровне сотен тысяч и миллионов и высокую точность определения массы (десятые доли ppm).

Учитывая ограниченность элементного состава большинства лигнинов (принадлежность только к СНО-классу), масс-спектрометрия на основе орбитальной ионной ловушки может рассматриваться как хорошая альтернатива методу масс-спектрометрии ИЦР. Orbitrap обладает разрешающей способностью до  $5 \cdot 10^5$  (при  $m/z$  200) и, при погрешности определения  $m/z$  на уровне 1 ppm, обеспечивает достаточно надёжное установление брутто-формулы аналитов с молекулярными массами вплоть до 1 кДа. Принципиальная схема орбитальной ловушки представлена на рисунке 7. Она состоит из 3 электродов: два внешних электрода, смотрящих друг на друга, имеют форму чаши и разделены диэлектриком. Центральный (осевой) электрод выполнен из металла и имеет веретенообразную форму. Между внешними и центральным электродами создают разность потенциалов, которая приводит к появлению электрического поля. Ионы в ловушке вращаются по определенным траекториям, которые образуются при суперпозиции трех видов циклических движений: вращательного движения вокруг внутреннего электрода, радиального движения между электродами и осевого колебания вдоль внутреннего электрода. От энергии ионов, углов и начального положения ионов в ловушке зависят вращательные и колебательные частоты, что приводит к тому, что каждый пакет ионов распределяется по угловым и радиальным координатам, образуя тонкое вращающееся кольцо [126].

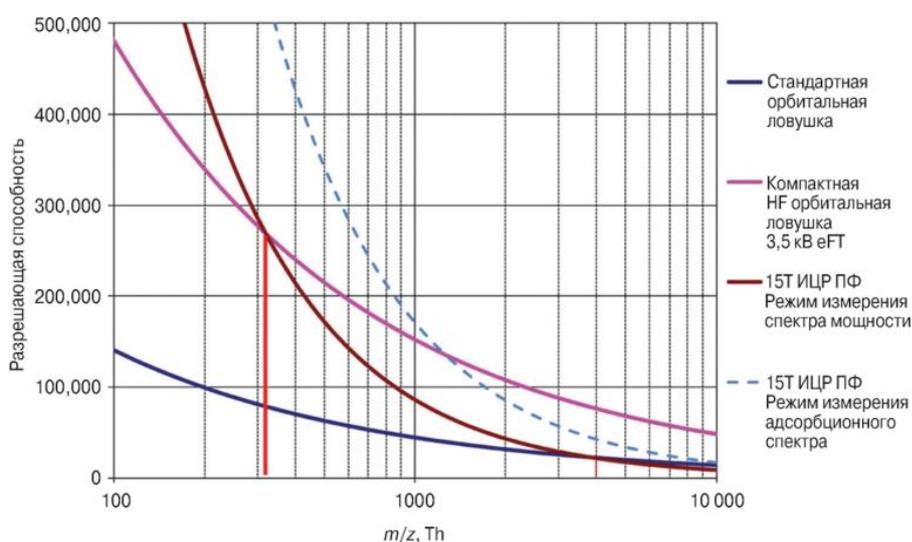


**Рисунок 7.** Принципиальная схема орбитальной ловушки и С-ловушки

Сравнение физических и аналитических характеристик Orbitrap с ВПМА и ИЦР позволяют наглядно продемонстрировать преимущества и недостатки Orbitrap по сравнению с другими масс-анализаторами. Несмотря на разницу в размерах и стоимости масс-анализаторы Orbitrap и ИЦР имеют ряд схожих характеристик. В обоих анализаторах ионы удерживаются в сверхвысоком вакууме, чтобы обеспечить долгое время жизни ионов, а обработка данных осуществляется при помощи Фурье преобразования. Однако, в масс-анализаторе ИЦР ионы двигаются в магнитном поле сверхпроводящих магнитов, а в Orbitrap – в электростатическом поле. Несомненным преимуществом масс-анализатора ИЦР является его способность принимать ионы с низкими и очень низкими энергиями и удерживать их длительное время в ловушке Пеннинга что обеспечивает исключительно высокую разрешающую способность в области низких масс, достигающую нескольких миллионов. В анализаторе Orbitrap в силу ограниченности его объема высокоэнергетические ионы сталкиваются с нейтральными частицами или другими ионами и, как следствие, в значительной степени теряются уже через несколько секунд после инъекции. Это ограничивает достижение в орбитальной ловушке величин разрешающей способности выше  $10^6$ .

В то же время, в силу различного механизма удерживания ионов, разрешающая способность масс-анализатора ИЦР обратно пропорциональна  $m/z$  иона, а для Orbitrap – квадратному корню из  $m/z$ . Следствием этого различия является то, что для пары масс-анализаторов ИЦР и Orbitrap существует

критическое значение  $m/z$ , при котором разрешающая способность орбитальной ионной ловушки начинает превосходить данную величину для ИЦР (рис. 8) [127]. Для компактных ионных ловушек с высокой напряженностью электростатического поля это критическое значение  $m/z$  лежит в диапазоне от 200 до 1000 при сравнении с ИЦР на основе сверхмощных 15 Т магнитов. Для более распространенных масс-спектрометров ИЦР с магнитной индукцией на уровне 7 Т оно смещается в сторону более низких масс аналитов, что не позволяет говорить о превосходстве техники ИЦР перед орбитальной ловушкой в диапазоне масс, наиболее важном для исследования лигнинов (300 – 2000 Да).



**Рисунок 8.** Зависимость разрешающей способности от  $m/z$  для масс-анализаторов ИЦР и Orbitrap [128]

Сравнение ВПМА с Orbitrap демонстрирует схожесть в движении ионов в электростатических полях, а также введение ионов в масс-анализатор с высокой кинетической энергией, что приводит к протеканию побочных процессов фрагментации внутри анализатора, что сильно ухудшает качество  $MS^n$  в обоих анализаторах и делает их более эффективными в качестве детекторов точных масс для внешнего источника фрагментированных ионов. Это объясняет, почему большинство орбитальных ионных ловушек и ВПМА используются в гибридных, а не автономных конфигурациях. При этом основным достоинством ВПМА считается высокая чувствительность, однако, из-за наличия «химических» фоновых ионов, состоящих из множества слабо связанных комплексов между ионами аналита, растворителя, а иногда и молекул газа [129], реальные пределы

обнаружения в анализаторах с преобразованием Фурье могут быть сопоставимы или ниже, так как все блуждающие, метастабильные или некогерентные ионы либо не выявляются, либо способствуют широкому, гладкому фону, который легко вычитается программным обеспечением [128].

В литературе представлен значительный объем исследований лигнина и родственных ему соединений с применением масс-спектрометрии высокого разрешения. Исторически, первыми для этих целей использовались методы времяпролетной МС и масс-спектрометрии ИЦР. Применение техники орбитальных ионных ловушек для изучения природных лигнинов было впервые предложено нашим коллективом (2016 г.) и продемонстрировало свою успешность [130]. К ее несомненным преимуществам относятся доступность оборудования (стоимость масс-спектрометров Orbitrap в 3–10 раз ниже по сравнению с ИЦР), низкая стоимость эксплуатации (не требуются криогенные жидкости), высокая стабильность шкалы масс (не требуется ежедневная рекалибровка для сохранения погрешностей ниже 1-3 ppm), а также возможность достижения разрешающей способности >100 000 на компактных настольных приборах в сочетании с высокой скоростью спектрального сканирования [128, 130].

Тем не менее, применение масс-анализаторов высокого разрешения позволяет решить проблему характеристики сложной смеси лигнинных веществ при условии решения проблем эффективной ионизации олигомеров лигнина, что является непростой задачей в силу особенностей строения и функционального состава биополимера. Естественно, в этом плане доминирующее положение занимают методы ионизации лигнина при атмосферном давлении, обеспечивающие мягкие условия ионизации и лишенные ряда недостатков, присущих МАЛДИ.

#### 1.4.2 Методы масс-спектрометрии с ионизацией лигнина при атмосферном давлении

Ключевым моментом в масс-спектрометрии лигнина является выбор условий ионизации, обеспечивающих, с одной стороны, максимальную эффективность генерации ионов и, с другой стороны, их минимальную фрагментацию в ионном источнике. В настоящее время наиболее широко используется ионизация при

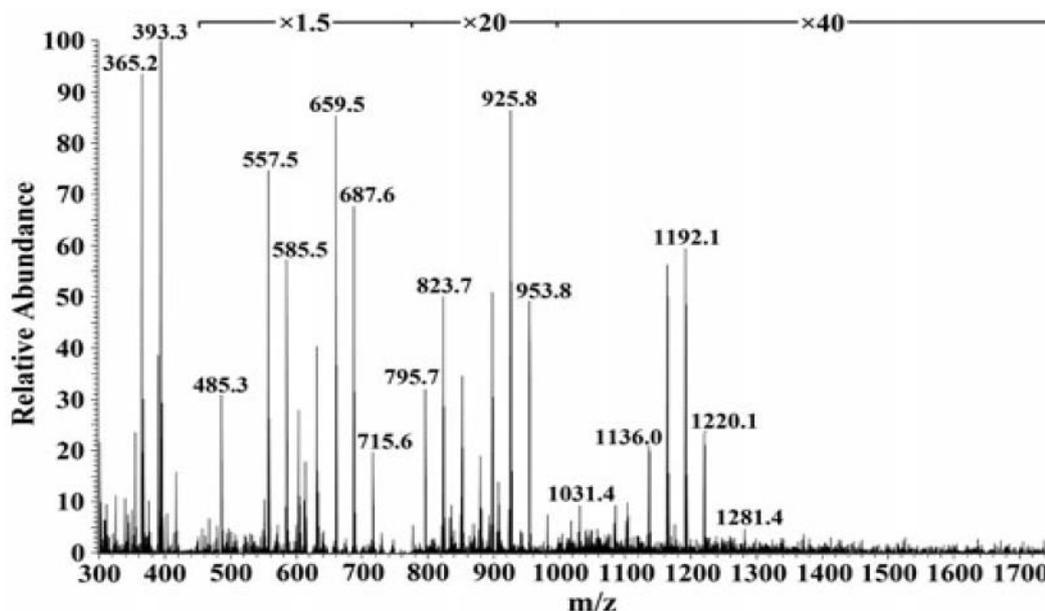
атмосферном давлении. Примеры её применения для изучения различных лигнинов подробно описаны в недавних обзорах Кубатовой и Фольмера [125, 131].

Ионизация при атмосферном давлении включает: ионизацию электрораспылением (ЭРИ), химическую ионизацию при атмосферном давлении (ХИАД) и фотоионизацию при атмосферном давлении (ФИАД). Ряд основных работ с применением различных типов ионизации и используемых масс-анализаторов, обобщен в таблице 4.

**Таблица 4.** Обзор методов масс-спектрометрического анализа лигнина

<b>Вид лигнина</b>	<b>Тип ионизации</b>	<b>Растворитель</b>	<b>Диапазон масс Масс-анализатор</b>	
Диоксан лигнин ели	«-» ХИАД «-» ФИАД «-» ЭРИ	0,1% NH <sub>4</sub> OH в ацетон/вода (9:1)	100–1000 Да Orbitrap	[130]
Лигнин тополя	«-» ХИАД	0,1% уксусная кислота в вода/метанол (1:1)	100–1000 Да Orbitrap	[132]
Продукты деградации лигнина	«-/+» ХИАД «-/+» ФИАД «-/+» ЭРИ	вода/метанол	100–600 Да ИЦР	[133]
Лигнин проса	«-» ЭРИ	вода/ацетонитрил	100–600 Да ИЦР	[134]
Гидролизный лигнин	«-» ЭРИ	0,25% NH <sub>4</sub> OH в ацетонитрил/вода (1:1)	100–1500 Да КИЛ	[135]
Сульфатный лигнин	«-» ЭРИ	Метанол/вода (1:1)	100–700 Да Orbitrap	[136]
Лигнин пшеничной соломы	«+/-» ФИАД	Уксусная кислота/Вода	«+»: 300–1120 Да «-»: 200–700 Да ВПМА	[137]
Лигнин багассы	«+» ЭРИ	ДМСО/метанол (9:1)	150–2000 Да ИЦР	[138]
Крафт-лигнин	«-» ЭРИ	Ацетонитрил/Вода (1:1)	120–1200 Да Orbitrap	[139]
Лигнин соломы пшеницы	«-/+» ЭРИ «-/+» ХИАД	Метанол/Вода (1:1)	120–600 Да ИРЦ	[140]

В настоящее время основным способом ионизации лигнина в масс-спектрометрических исследованиях является электрораспыление. Ряд исследований был направлен на анализ нативного лигнина с использованием ЭРИ МС. В основном использовался режим детектирования отрицательно заряженных ионов. Большинство масс-спектров были получены в диапазоне масс до 1000 [111, 130, 141] и 1500 Да [132, 142, 143] часто с основной целью характеристики продуктов разложения лигнина [141, 144, 145]. Полученные масс-спектры (рис. 9) в режиме ЭРИ отличались небольшим количеством интенсивных сигналов, часть из которых относилась не к лигнинным компонентам, а примесным соединениям, которые хорошо ионизируются в режиме ЭРИ вследствие наличия ионогенных групп или поверхностной активности, способствующей приоритетной миграции к поверхности капель и переходу в газовую фазу в ионном источнике (например, жирные кислоты).



**Рисунок 9.** Пример масс-спектра лигнина ели, полученный с использованием ЭРИ с детектированием отрицательно заряженных ионов [130]

Следует отметить, что большинство этих исследований проводились обычно с использованием гидроксида аммония с различной концентрацией (0.1–2.5%) в качестве щелочной добавки, обеспечивающей перевод лигнина в анионную форму. Необходимость использования гидроксида аммония была подтверждена исследованием на модельных соединениях лигнина, показывающих эффективное

депротонирование молекул по сравнению с ограниченной фрагментацией в присутствии гидроксида натрия [124, 145].

В работе Андриановой [146] было показано, что выбор как буферного электролита, так и его концентрации оказывает значительное влияние на получаемый масс-спектр. Кроме того, исследование модельных соединений, различающихся наличием и количеством гидроксильных, метоксильных и карбоксильных групп показали, что ионизация с детектированием положительно заряженных ионов является более универсальной [146]. Хотя ионизация с генерированием отрицательно заряженных ионов обеспечивала более высокую чувствительность анализа для соединений с несколькими гидроксильными группами или карбоновых кислот, соединения с преобладанием метоксильных групп не могли быть эффективно ионизированы в данном режиме [146]. Помимо оптимизации условий ЭРИ на модельных соединениях лигнина, была показана важность проведения прямой оценки с использованием реальных образцов биополимера. Природа добавляемого буферного электролита не оказывала существенного влияния на эффективность ионизации лигнина. При этом присутствие многозарядных частиц было значительным только при добавлении 0,1 и 0,2 М муравьиной кислоты [146]. Возможно, такое подкисление вызывало изменение конформации макромолекул лигнина и разрыв внутримолекулярных водородных связей по аналогии с моделью выброса заряда для белков [147]. Аналогичным образом, некоторые исследователи предложили, что для лигнина характерна линейная структура [141].

Для повышения эффективности ионизации лигнина при электрораспылении авторы работы [148] предложили использовать подход, основанный на катионировании молекул аналита ионами лития, обладающими высокой плотностью заряда и образующими устойчивые аддукты с лигнином в газовой фазе. Авторы сообщают о успешном секвенировании катионированных олигомеров лигнина с применением техники диссоциации, активированной соударениями (ДАС). Также в данной работе выявлены специфичные пути фрагментации катионированных олигомеров лигнина как основы для структурных исследований продуктов деполимеризации природного высокомолекулярного соединения.

Для характеристики молекулярного состава продуктов деградации лигнина известно использование техники ВЭЖХ-ЭРИ-МС/МСВР. Это продемонстрировано в работе [134], объектом исследования которой являлись низкомолекулярные соединения, образующиеся при разрушении органосольвентного лигнина, выделенного из проса. Применение хроматографического разделения позволило отделять мономеры и димеры лигнина, а также отдельно изучить лигноуглеводные комплексы. Группа исследователей под руководством Тернера опубликовала ряд работ по идентификации лигнинных олигомеров в крафт-лигнине с использованием техники ВЭЖХ-ЭРИ-МС<sup>n</sup>/МСВР [139]. Стратегия предварительного установления структур лигнинных олигомеров была разработана на основе анализа потерь нейтральных частиц в МС<sup>3</sup> спектрах в сочетании с методом анализа главных компонент и квадратичного дискриминантного анализа для сравнения и обработки полученных данных. Разработанный подход улучшил предварительный выбор потенциальных структур олигомеров лигнина в сложных смесях (так из 587 обнаруженных пиков 36 были идентифицированы как структуры лигнина). В другом исследовании [140] использовалась предварительная жидкостная экстракция для выделения из образца лигнина соломы пшеницы углеводов, органических кислот, фенолов с последующим анализом фракций методом ВЭЖХ-ЭРИ-МС<sup>n</sup>/МСВР. Такой подход позволил исследователям наблюдать и объяснять строение моно-, ди-, три- и тетрамерных родственных лигнину ароматических соединений, а также лигноуглеводных комплексов.

Несмотря на столь широкое применение ЭРИ-МС для изучения как лигнина, так и его продуктов деградации, данный метод не лишен недостатков, основными из которых являются высокая чувствительность к примесям, которые могут содержаться в растворителе или препарате лигнина (например, жирные кислоты), а также низкая эффективность ионизации олигомеров лигнина, для повышения которой необходимо применять катионирование или сильнощелочную среду (так как рК фенольных гидроксильных групп в лигнине составляет 10–11). Это подразумевает применение нелетучих солей, что нежелательно в условиях масс-спектрометрического анализа, а применение сильнощелочных сред для перевода лигнинных веществ в анионную форму чревато частичной деградацией простых эфирных связей в лигнине и окислением фенольных структур.

Основной альтернативой ЭРИ в исследованиях лигнина является химическая ионизация при атмосферном давлении. Описанные в литературе исследования с применением ХИАД-МС были в основном направлены на анализ низкомолекулярных продуктов деструкции лигнина. Только единичные исследования посвящены характеристике собственно малоизмененного лигнина с использованием данной техники (табл. 4). Достоинство метода ХИАД-МС заключается в способности к ионизации слабополярных молекул и низкой чувствительности к матричным эффектам. Данный метод был применен для анализа лигнина соломы пшеницы, который был выделен из природного материала смесью муравьиной и уксусной кислот с водой [141]. Однако было установлено, что лигнин подвергается деградации при относительно жестких условиях ХИАД, что приводит к отсутствию интенсивных сигналов в масс-спектрах при  $m/z > 600$ . Авторами работы [145] на примере модельных соединений лигнина было показано, что при химической ионизации структурные фрагменты макромолекулы лигнина легко отщепляют воду и формальдегид, а также подвержены деметилированию. Также отмечается, что ХИАД-МС имеет ограниченную применимость для записи репрезентативных масс-спектров лигнина за счет его низкой эффективности ионизации по отношению к группам со слабыми кислотными свойствами.

Сообщалось [137], что ФИАД с генерированием отрицательно заряженных ионов обеспечивает более эффективную ионизацию лигнина по сравнению с ЭРИ и ХИАД, особенно в случае лигнинных олигомеров. Применение данной техники позволило получить более информативные масс-спектры как в области низких, так и высоких масс [137]. Следует отметить, что в отличие от предыдущих работ, проведенных в водном метаноле с добавлением уксусной или муравьиной кислоты, исследования с применением ФИАД продемонстрировали эффективное использование в качестве растворителя лигнина системы диоксан/метанол/хлороформ (1:1:1) с одновременным использованием толуола в качестве допанта для ФИАД [137].

Позднее исследования нашего коллектива [130] показали несомненные преимущества применения ФИАД-МС для анализа природных лигнинов. Ключевыми из них является низкая чувствительность к примесным компонентам, входящим в состав лигнина и легко ионизируемым в ЭРИ, а также отсутствие

существенной деструкции олигомеров лигнина благодаря более мягким условиям ионизации по сравнению с ХИАД. В этой же работе впервые применён ацетон в качестве растворителя пробы и допанта, как альтернатива традиционным для ФИАД-МС допантам на основе толуола или анизола, не способным растворять лигнин и не смешивающимся с эффективными растворителями данного биополимера.

Используемый растворитель в режиме ФИАД-МС может оказывать значительное влияние на эффективность ионизации, так как он выполняет две функции: растворяет лигнин и способствует ионизации (выступает в качестве реагента или допанта). Лигнин нерастворим в воде и спиртах, поэтому в качестве растворителей при изучении данного биополимера различными методами обычно используют растворы щелочей или высокоосновные апротонные растворители, такие как диметилсульфоксид, N,N-диметилформамид, 1,4-диоксан, тетрагидрофуран. Некоторые растворители лигнина, помимо низкой летучести, часто вызывают коррозию или могут приводить к нежелательным реакциям и, следовательно, не подходят для масс-спектрометрического анализа. Из этих соображений предпочтительными растворителями являются ацетонитрил, 1,4-диоксан, ацетон, тетрагидрофуран. Метанол может быть ограниченно использован для наиболее низкомолекулярных фракций лигнина (мономеры, димеры, тримеры) и продуктов его деполимеризации. Эти растворители обладают такими преимуществами как высокая летучесть и смешиваемость с водой, при этом добавка последней может увеличить растворимость лигнина [130]. Например, было показано, что лигнин растворим в ацетоне с содержанием 10% воды [130], а также в смеси ацетонитрил / вода (1:1) [146]. В режиме ФИАД допирующая добавка используется для содействия ионизации. Так толуол и ацетон были одними из распространенных допирующих добавок, обеспечивающих сходную эффективность ионизации, но последний повышал растворимость лигнина [130].

Таким образом применение метода ФИАД-МСВР является перспективным направлением для изучения молекулярного состава природного лигнина. В то время как метод ЭРИ-МСВР по большей части сконцентрирован на анализе продуктов деградации лигнина и ограничен в возможностях анализа природного

лигнина, метод ФИАД-МСВР является эффективной альтернативой для анализа структурно сохранённых олигомеров лигнина.

#### 1.4.3 Методы визуализации и математической обработки данных масс-спектрометрии высокого разрешения

Получаемые масс-спектры сверхвысокого разрешения лигнина содержат сигналы тысяч уникальных олигомерных соединений. Анализ таких сложных массивов данных требует применения современной методологии обработки данных [149, 150], позволяющей логически группировать детектируемые соединения так, чтобы исследователь мог легко вычленять индивидуальные характеристики различных образцов. Одним из её основоположников был Дирк Виллем ван Кревелен, разработавший в 1950 г. подход к визуализации химического состава углей [151] в виде так называемых диаграмм ван Кревелена (ДВК) [152, 153]. Последние выражают состав сложной смеси в координатах элементных соотношений и, применительно к масс-спектрометрии высокого разрешения, основываются на данных об элементных составах всех соединений, получаемых на основе их точных масс. Они дают возможность быстрой визуальной сортировки различных классов соединений в пределах диаграммы, сравнения различных сложных образцов путем сопоставления их «образов» в двумерном или трехмерном пространстве ван Кревелена (например, в координатах Н/С – О/С или Н/С – N/С). Так, в работе [154] с применением ДВК была наглядно дана характеристика изменения химического состава лигнина на молекулярном уровне в ходе ферментативной обработки лакказой, продуцируемой грибом *Trametes versicolor*. Были зафиксированы четкие изменения получаемый «образов» химического состава до и после ферментативной деградации лигнина. В работе [133] представлены результаты исследования технического лигнина с применением различных техник ионизации при атмосферном давлении в сочетании с масс-анализатором ИЦР. Для наглядной визуализации масс-спектров такого лигнина, содержащего в своем составе гетероатомы серы и фосфора, также применялись диаграммы ван Кревелена. Учитывая перспективность данного метода визуализации масс-спектров высокого разрешения, Кив с соавторами [155] разработал программный инструмент на языке программирования Python для

интерактивной визуализации масс-спектрометрических данных. Данный сборник скриптов полностью настраивается на любые параметры по желанию исследователя.

Широкий круг работ с привлечением хемометрической обработки масс-спектров сверхвысокого разрешения был выполнен проф. Перминовой при исследовании гуминовых кислот [156], природного органического вещества [157, 158] и синтетических лигниноподобных веществ [159]. Сочетание методов масс-спектрометрии ИЦР с визуализацией молекулярных составов сложных объектов в диаграммах ван Кревелена представляет собой мощный аналитический инструмент позволяющий дифференцировать компонентный состав сложной смеси по классам соединений.

Метод Кендрика основан на вычислении дефектов масс (различие точной и номинальной масс) всех компонентов сложной смеси, при этом в качестве точной и номинальной масс используются величины, основанные на массе звена Кендрика – функциональной группы (структурного звена), на которую могут отличаться компоненты смеси. Точная масса звена Кендрика принимается равной номинальной (например, для метиленовой группы  $\text{CH}_2$  масса Кендрика равна 14,0000 и дефект масс равен нулю). При таком подходе, на диаграммах Кендрика в координатах номинальная масса Кендрика – дефект массы Кендрика все компоненты смеси, отличающиеся количеством звеньев Кендрика, будут находиться на горизонтальных линиях (внедрение звена с нулевым дефектом массы не приводит к изменению дефекта массы). При кажущейся простоте концепции метод позволяет извлекать значительные объёмы структурной информации из масс-спектров высокого разрешения сложных смесей и обладает существенными преимуществами по сравнению с методом ван Кревелена. Прежде всего, к ним относится отсутствие необходимости предварительного расчёта элементных составов соединений, который может быть выполнен с высокой достоверностью лишь для низких масс. Дефект массы как разность двух масс может быть с высокой точностью определен и для  $m/z > 1000$ , что открывает перспективы исследования образцов с высокими молекулярными массами. Кроме того, прослеживание гомологических рядов от малых надёжно идентифицируемых

молекул к высокомолекулярным соединениям позволяет сделать важные выводы об их структуре.

Анализ дефектов масс Кендрика успешно использовался для изучения сложных масс-спектров нефти [160-162], природного органического вещества [163] и гидротермальных экстрактов угля [164]. В работе [165] он применялся для визуализации масс-спектра сырой нефти, в состав которой входят соединения, содержащие серу и кислород в широком диапазоне масс.

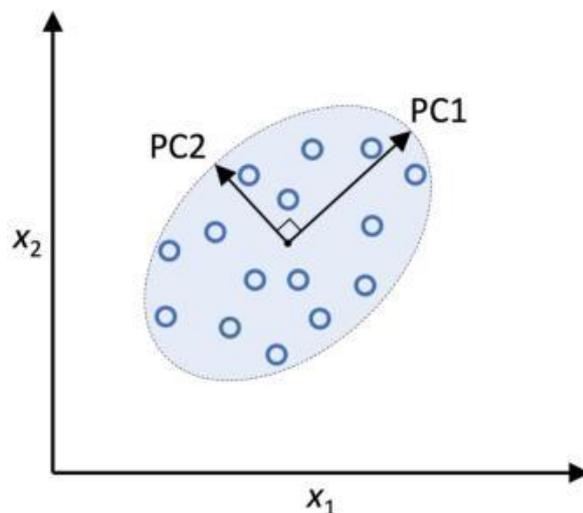
Метод Кендрика нашел свое применение и для анализа синтетических полимеров. Так коллектив авторов под руководством Фуке выпустил цикл публикаций о применении дефектов масс Кендрика для визуализации масс-спектров полимеров с массами, насчитывающими несколько тысяч дальтон [166, 167]. Особенно интересна предложенная ими концепция анализа дефектов масс с применением дробных базовых единиц, получаемых делением масс звеньев Кендрика. Метод позволяет существенно повысить разрешение диаграмм Кендрика, разделяя сигналы близких по своей структуре соединений. Следствием этого является возможность применения метода для данных масс-спектрометрии низкого разрешения для диапазона малых масс (<1 кДа) и для масс-спектров высокого разрешения в диапазоне высоких масс (>1 кДа) [168].

Лигнин демонстрирует такой же сложный набор отдельных компонентов («лигном»), что и сырая нефть, тем не менее, в литературе до сих пор имеются лишь единичные примеры применения метода Кендрика для анализа этого природного высокомолекулярного соединения. Первенство в данной области принадлежит проф. Фольмеру с соавторами, применявшими диаграммы Кендрика для визуализации масс-спектров продуктов деполимеризации лигнинов, полученных под действием УФ излучения [169], а также электрохимической деструкции [170]. Учитывая, что, в отличие от нефти, лигнин характеризуется большим многообразием структурных звеньев и функциональных групп, Фольмером предложено использование так называемых «модифицированных» или «многомерных диаграмм дефектов масс», которые позволяют выявлять более сложные структурные модификации [171]. В публикации предложен новый упрощённый подход к визуализации данных дефектов масс Кендрика для деполимеризованных субъединиц лигнина и построений графиков значений

дефектов массы в зависимости от степени ненасыщенности. Используя в качестве базы для расчёта дефектов масс Кендрика метоксильные и фенольные группировки, которые представляют собой мономерспецифичные компоненты лигнина, авторам удалось классифицировать и группировать сложную смесь лигнинов. В последующих исследованиях группа применила аналогичный метод визуализации для анализа модельных препаратов фенолформальдегидной смолы, полученной на основе компонентов лигнина [172]. Варьируя величины массы Кендрика в соответствии с целевыми аналитами, они смогли добиться четкой визуализации компонентов, принадлежащих к различным классам соединений. В данной работе авторы несколько изменили концепцию построения диаграмм Кендрика путем использования фенола в качестве базовой единицы.

Самая последняя работа группы Тернера включает разработку нецелевого метода идентификации фенольных соединений в образцах сложного технического лигнина [173] на основе сверхкритической флюидной хроматографии – масс-спектрометрии высокого разрешения с комбинацией методов анализа главных компонент, квадратичного дискретного анализа и дефектов масс Кендрика для одновременного анализа сложных масс-спектров. Несколько экспериментов с  $MS^n$  были использованы для классификации как мономеров лигнина, так и димеров, тримеров или тетрамеров. Для неизвестных соединений исследователи смогли предложить химические структуры, основанные на установленной химической формуле, степени ненасыщенности и путях фрагментации в  $MS^3$  спектрах.

Для сравнительного анализа больших объемов масс-спектрометрических данных достаточно давно и успешно применяется метод анализа главных компонент (РСА). Основная цель данного метода заключается в уменьшении размерности набора данных, которые состоят из множества переменных, коррелирующих друг с другом, с учетом сохранения вариабельности [174]. Осуществляется это за счет преобразования имеющихся переменных в новый набор, которые называются главными компонентами. Главные компоненты упорядочены так, что дисперсия данных в исходных координатах уменьшается от первой до последней, т.е. главная компонента 1 (PC1) обладает максимальной дисперсией, которая присутствовала в исходных данных. Главные компоненты располагаются ортогонально друг относительно друга (рис. 10).



**Рисунок 10.** Метод анализа главных компонент

Данный метод нашел свое отражение во многих работах как для первичной обработки данных [175], так и для более глубокого анализа масс-спектрометрических данных. Например, в работе [176] метод главных компонент применялся для нахождения маркеров «синдрома быстрого увядания оливок» в масс-спектрах экстрактов листьев оливковых деревьев. Было обнаружено 19 различных органических соединений – маркеров в результате многомерного анализа данных, полученных методом ВЭЖХ-ЭРИ-МСВР. Используемый подход может быть использован в качестве быстрого и надежного метода биохимической характеристики состава растений. В другой работе [177] PCA-анализ применялся для дифференциации итальянских оливковых масел принадлежащим к двум разным годам урожая и происходящие из разных регионов Италии. Исследователям удалось надежно идентифицировать одинаковые сорта масел по результатам анализа 100 различных образцов.

В работе [178] были охарактеризованы лигноцеллюлозные матрицы шипов 15 видов кактусов. Измельченные образцы анализировали методом Пиро-ГХ/МС. Всего было идентифицировано и классифицировано 451 соединение. Основными классами соединений были кетоны, сложные эфиры, спирты, фураны, углеводороды, производные *n*-гидроксифенила, гваяцильные структуры, а также катехины. По результатам кластерного и факторизационного анализа было

успешно проведено таксономическое разделение (на уровне рода) всех видов кактуса.

Как сообщалось ранее [179], метод главных компонент может применяться для разделения лигнинов по их происхождению. В данном исследовании в качестве метода получения информации использовалась инфракрасная спектроскопия. Результаты, представленные в этом исследовании, показывают, что инфракрасные спектры являются важным источником информации для быстрой качественной и количественной характеристики химической структуры и функциональных свойств лигнинов. Анализ методом главных компонент позволил классифицировать все исследуемые лигнины на выделенные из растений (природные лигнины), полученные из технологических процессов (технические лигнины) и модифицированные лигнины. Тем не менее, примеров применения метода анализа главных компонент для классификации природных или малоизмененных лигнинов на основе данных масс-спектрометрии высокого разрешения в литературе до сих пор не встречается.

### **Заключение к главе 1**

Лигнин является вторым по распространённости биополимером в природе и рассматривается как перспективный источник широкого круга ценных ароматических соединений. Тем не менее, применение лигнина серьёзно сдерживается лабильностью его состава и молекулярно-массовых характеристик получаемых препаратов, а также нерегулярностью структуры полимера. При этом лигнины до сих пор остаются малоизученными высокомолекулярными соединениями, структура которых и особенности ее формирования являются предметом дискуссий. Наиболее перспективным методом структурных исследований лигнина, лежащим в основе нового научного направления – лигномики, является масс-спектрометрия высокого разрешения, позволяющая исследовать наиболее сложные объекты, состоящие из сотен и тысяч компонентов.

В настоящее время для изучения лигнина чаще всего используют ионизацию электрораспылением, однако данный метод имеет ряд существенных недостатков, связанных с низкой эффективностью ионизации, высокой чувствительностью к примесным соединениям или же необходимостью проводить предварительную

модификацию биополимера. Низкая эффективность ионизации лигнина при ЭРИ связана в первую очередь с низким содержанием ионогенных функциональных групп, хорошо ионизируемых в режиме электрораспыления. Для менее полярных соединений, таких как лигнин, более эффективным методом по сравнению с ЭРИ является фотоионизация при атмосферном давлении, впервые предложенная И.А. Ревельским [180, 181].

Ограниченность элементных составов (С, О, Н) значительно упрощает интерпретацию и определение брутто-формулы олигомеров лигнина, что позволяет отказаться от применения дорогостоящих масс-анализаторов ионного циклотронного резонанса. В этом плане перспективной альтернативой им выступает разработанный А. Макаровым масс-анализатор на основе орбитальной ионной ловушки, разрешающая способность и точность определения масс которого могут обеспечить надежное определение элементных составов лигнинных олигомеров. Особенно перспективным представляется сочетание техники масс-спектрометрии Orbitrap высокого разрешения с фотоионизацией при атмосферном давлении для получения высокоинформативных масс-спектров лигнина. Несомненные преимущества такого подхода успешно продемонстрированы нашим коллективом при изучении олигомерных продуктов деполимеризации технических лигнинов [182, 183]. Тем не менее, в литературе до сих пор отсутствуют какие-либо систематические исследования, посвященные методологическим аспектам применения ФИАД-МС для глубокой характеристики и анализа природных лигнинов.

Наряду с разработкой методов получения масс-спектров лигнина, остро стоит проблема их экспрессной интерпретации и визуализации для получения общей «картины» химического состава лигнина на молекулярном уровне, извлечения как можно большей структурной информации, сравнения и классификации лигнинов различного происхождения, отслеживания трансформации химического состава лигнина в процессах его химической переработки и модификации. В этом плане наиболее перспективными являются современные математические методы обработки масс-спектрометрических данных с построением диаграмм ван Кревелена, а также концепции дефектов масс Кендрика. Имеющиеся в литературе данные о применении таких подходов в

основном сконцентрированы на анализе низкомолекулярных продуктов деградации лигнина, в то время как их применение для анализа природного лигнина практически не описано.

На восполнение указанных пробелов направлено настоящее исследование, посвященное разработке 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.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Оборудование

В работе использовалось следующее основное аналитическое оборудование:

- ВЭЖХ/МС система, состоящая из гибридного масс-спектрометра QExactive Plus (Thermo Scientific, США) с масс-анализатором на основе орбитальной ионной ловушки при разрешении 70 000 (на половине высоты пика, для  $m/z$  200), с источником ионов Ion Max, оснащённым системой ФИАД с криптоновой лампой с энергией квантов 10.6 эВ, а также жидкостного хроматографа LC-30 «Nexera» (Shimadzu, Япония), включающего два насоса LC-30AD, дегазатор DGU-A5, автосамплер LC-30AC;
- Система эксклюзионной хроматографии LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), состоящей из автосамплера SIL-20A, двухплунжерного насоса LC-20AD, вакуумного дегазатора DGU-A3, термостата колонок STO-20A и спектрофотометрического детектора SPD-20A;
- СНNS-анализатор EuroEA-3000 (EuroVector, Италия) с катарометрическим детектором;
- Система пиролитической газовой хроматографии – масс-спектрометрии, состоящая из газового хроматомасс-спектрометра GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) и пиролизера EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония);
- ЯМР спектрометр «AVANCE III» с рабочей частотой 600 МГц (Bruker, Германия) и оснащенный широкополосным двухканальным датчиком высокого разрешения для жидких образцов.

Измерение водородного показателя растворов проводили на иономере «Эксперт 001-3.01» (Эконикс – Эксперт, Россия). Использовался комбинированный стеклянный электрод ЭСК 10601/7, заполненный 3М раствором хлорида калия.

Для отбора точных объемов жидких образцов и растворителей применялись одноканальные механические дозаторы proline Plus с переменным объемом 0,5-10, 10-100 и 100-1000 мкл (Biohit, Финляндия). Погрешность дозирования не превышает 2%.

Для взятия точных навесок использовались аналитические весы XPE205 (Mettler-Toledo, Швейцария), электронные прецизионные весы серии UW620H (Shimadzu, Япония).

Фугование образцов проводилось в пробирках Эппендорфа на лабораторной центрифуге Sigma 1-14 (SIGMA Laborzentrifugen, Германия), для упаривания использовался ротационный испаритель RV 10 digital V (ИКА, Германия).

## 2.2 Материалы и реагенты

В работе использовались следующие органические растворители и химические реактивы: ацетон (х.ч., Компонент-реактив, С.-Петербург), диоксан (ч.д.а, Компонент-реактив, С.-Петербург), тетрагидрофуран (ч.д.а., Компонент-реактив, С.-Петербург), метанол (J.T. Baker LC/MS grade, Avantor, Польша), ацетонирол 0 сорта (Криохром, Россия), соляная кислота (х.ч., 35-38%, Нева Реактив, Россия), натрия гидроксид (х.ч. Нева Реактив, Россия), аммония гидроксид (28-30%, Sigma-Aldrich, Испания), гидрокарбонат натрия, муравьиная кислота (98%, ACS Reagent, Sigma-Aldrich).

Для выделения, очистки и приготовления исследуемых растворов препарата лигнина использовали 1,4-диоксан, ацетон и диэтиловый эфир квалификации «ч.д.а», гидрокарбонат натрия, соляную кислоту квалификации «х.ч.» (Компонент-реактив, Россия).

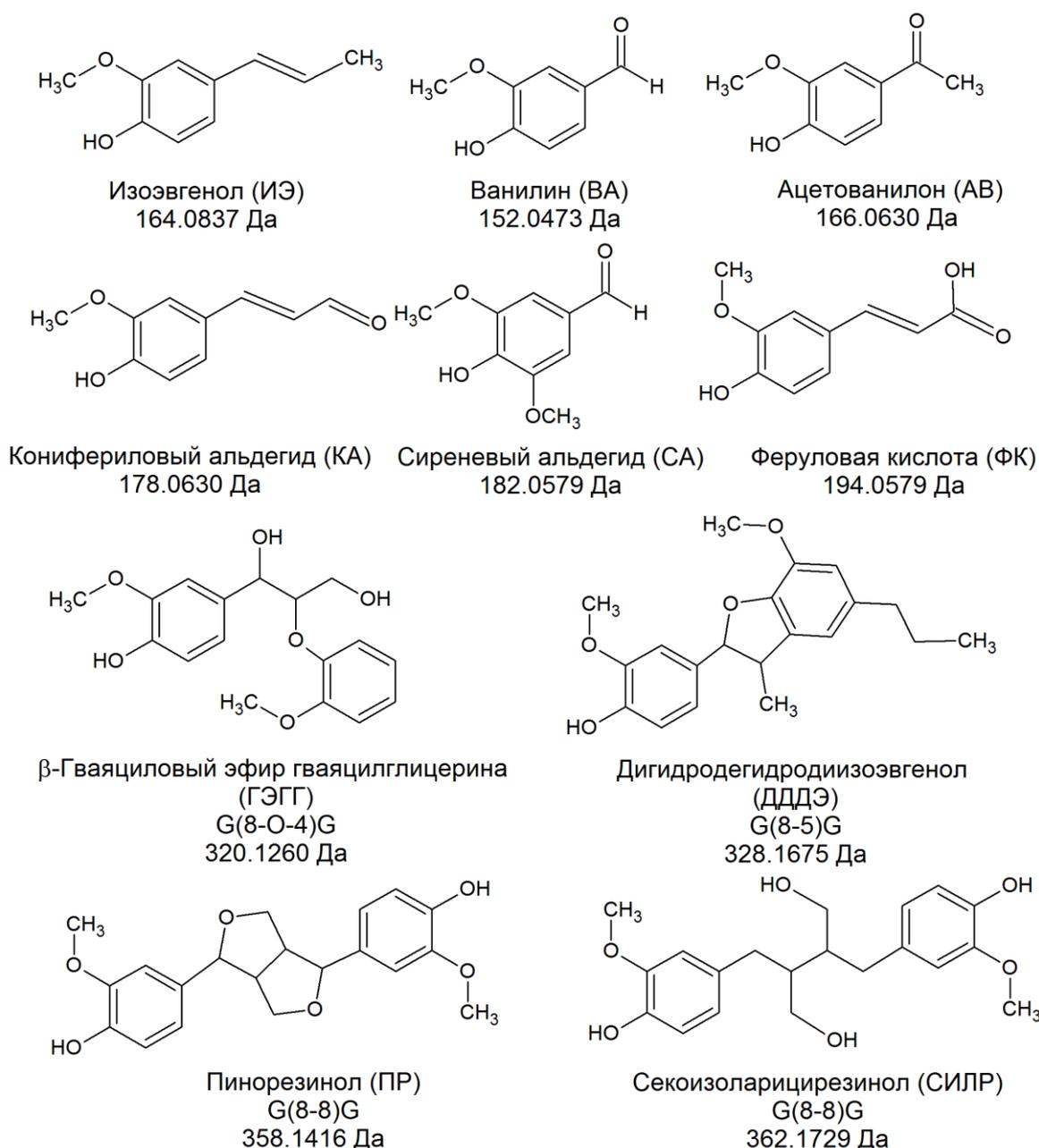
Для нитробензольного окисления лигнина использовали нитробензол ( $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Испания), дихлорметан стабилизированный (AppliChem, Германия), гидроксид натрия («х.ч.», Химмед, Россия), соляную кислоту («х.ч.», компонент-реактив, Россия).

Во всех экспериментах использовалась ультрачистая вода (Тип I, полученная с использованием системы Milli-Q (Millipore, Франция).

## 2.3 Модельные соединения лигнина

В качестве модельных соединений использовались 6 мономерных (изоэвгенол, конифериловый альдегид, феруловая кислота, ацетованилон, ванилин и сиреневый альдегид) и 4 димерных фенольных соединения: ( $\beta$ -гваяциловый эфир гваяцилглицерина, ГЭГГ; секоизоларицирезинол, СИЛР;

дигидродегидродиизоэвгенол, ДДДЭ; пинорезинол, ПР). Структурные формулы данных соединений представлены на рисунке 11. Все соединения (за исключением ДДДЭ) были приобретены у Sigma-Aldrich (Германия) и Fluka (Швейцария); концентрация основного вещества в каждом из них составляла не менее 98%. Дигидродегидродиизоэвгенол синтезирован из изоэвгенола в соответствии с известной процедурой, описанной в работе [184]. Данные соединения выбраны в качестве объектов исследования, моделирующих основные типы структур и связей в макромолекуле лигнина.



**Рисунок 11.** Структурные формулы и моноизотопные массы модельных соединений

## 2.4 Препараты лигнина и их характеристика

В качестве объектов исследования использовались малоизменённые препараты диоксанлигнина хвойной и лиственной древесины, различных пород соломы злаковых, однолетних растений, мхов. Препараты диоксанлигнинов выделяли по методу Пеппера [51] с небольшими модификациями. Исходное сырьё предварительно измельчали до состояния опилок, высушивали на воздухе, проводили 48-часовую экстракцию ацетоном в аппарате Сокслета для удаления экстрактивных веществ. Навеску подготовленного растительного сырья (100 г) помещали в круглодонную колбу, заливали 800 мл 0,2 М раствором HCl в смеси 1,4-диоксана с водой (9:1) и оставляли на 30 мин для пропитки при комнатной температуре в инертной атмосфере. Далее смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 4 часов в токе азота (99,99%), после чего нерастворившийся остаток отфильтровывали на воронке Бюхнера, дважды промывали порциями 1,4-диоксана объёмом 40 мл и полученный раствор объединяли с экстрактом. Жидкость нейтрализовали  $\text{NaHCO}_3$  (20–25 г) до прекращения выделения газа, продували азотом в течение 5 мин, герметично закрывали колбу и оставляли на ночь. После фильтрации раствор упаривали в вакууме на ротационном испарителе до объёма 100 мл. Полученный концентрат по каплям приливали в 8-кратный избыток воды. Осаждённый лигнин отделяли от раствора центрифугированием и высушивали в вакууме. Остаточные количества примесей удаляли переосаждением лигнина из 1,4-диоксана в диэтиловый эфир. Рассчитывали выход полученных препаратов лигнина, определяли молекулярно-массовые характеристики (среднечисловую  $M_n$ , среднемассовую  $M_w$  и степень полидисперсности  $D$ ) методом эксклюзионной хроматографии (раздел 2,7), S:G:H соотношения методом пиролитической ГХ-МС (раздел 2,8) и элементные составы (раздел 2.9). Перечень выделенных препаратов и их характеристики представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Перечень выделенных препаратов диоксанлигнина и основные их характеристики

Тип сырья	Элементный анализ	Эксклюзионная хроматография			Пиро-ГХ/МС		
		С/Н/О, %	M <sub>n</sub> , Да	M <sub>w</sub> , Да	D	S, %	G, %
<b>Лигнины хвойной древесины</b>							
Ель ( <i>Picea</i> )	67,0/6,4/26,6	3000	8400	2,8	0	89	11
Сосна ( <i>Pinus sylvestris</i> )	64,5/9,1/26,4	780	5100	6,5	0	96	4
Кедр ( <i>Cedrus</i> )	62,0/7,7/32,6	1000	4100	4,2	0	92	8
Можжевельник ( <i>Juniperus</i> )	61,6/7,4/31,0	2300	5800	2,6	1	92	7
<b>Лигнины лиственной древесины</b>							
Тополь ( <i>Populus</i> )	59,5/7,5/33,0	970	3400	3,5	31	37	32
Яблоня ( <i>Malus</i> )	59,1/9,3/31,6	1100	4750	4,3	52	42	7
Береза ( <i>Betula pendula</i> )	59,7/7,7/32,6	780	5100	6,5	57	37	5
Бук ( <i>Fagus</i> )	59,0/7,5/33,5	1100	5800	5,4	48	52	1
Липа ( <i>Tilia</i> )	58,0/7,4/34,6	980	3900	4,0	55	40	5
Ива ( <i>Salix</i> )	59,7/7,7/32,6	1000	5700	5,6	41	49	10
Черемуха ( <i>Prunus padus</i> )	56,8/7,4/35,8	1350	3700	2,7	49	47	4
Сирень ( <i>Syringa vulgaris</i> )	59,7/7,7/32,6	1900	4800	2,8	54	45	1
Рябина ( <i>Sorbus</i> )	55,7/7,7/37,0	740	5500	7,5	75	23	2
Ольха ( <i>Alnus</i> )	58,4/6,1/35,5	650	3900	4,0	55	40	5
Абрикос ( <i>Prunus armeniaca</i> )	57,2/7,3/35,5	2100	6800	3,3	60	35	5
Слива ( <i>Prunus</i> )	55,0/7,1/37,9	1900	7200	3,8	61	32	7
Карельская береза ( <i>Betula pendula</i> <i>var. carelica</i> )	59,7/7,7/32,6	730	3500	4,8	52	42	5
<b>Лигнины травянистых растений</b>							
Крапива ( <i>Urtica dioica</i> )	60,3/2,2/37,5	1400	1700	1,2	17	75	8
Осока ( <i>Carex heleonastes</i> )	59,2/6,7/32,4	300	2000	6,7	15	68	17
Овес ( <i>Avena sativa</i> )	61,8/10,8/27,4	1150	2750	2,4	14	75	11
Кипрей ( <i>Chamaenerion</i> <i>angustifolium</i> )	59,4/7,1/33,5	1000	2600	2,6	25	66	9

**Таблица 5** (продолжение). Перечень выделенных препаратов диоксанлигнина и основные их характеристики

Тип сырья	Элементный анализ	Эксклюзионная хроматография			Пиро-ГХ/МС		
		С/Н/О, %	M <sub>n</sub> , Да	M <sub>w</sub> , Да	D	S, %	G, %
<b>Лигнины травянистых растений</b>							
Тритикале ( <i>Triticosecale</i> )	61,1/10,3/28,6	1200	2750	2,3	50	39	11
Кукуруза ( <i>Zea máys</i> )	59,4/8,7/31,9	680	2700	4,0	20	65	15
Пшеница ( <i>Triticum</i> )	59,5/9,6/30,9	780	3000	3,8	28	67	5
Пырей ( <i>Elytrigia</i> )	58,9/6,8/32,4	300	2050	6,7	10	82	7
Камнеломка ( <i>Saxifraga</i> )	60,5/7,4/32,1	2300	4200	1,8	12	39	49
Гречиха ( <i>Fagopyrum</i> )	68,9/13,8/17,3	1200	2750	2,3	50	39	11
<b>Лигнины моховидных растений</b>							
Кукушкин лен ( <i>Polytrichum commune</i> )	57,9/5,9/33,8	1100	2650	2,4	7	35	58
Абиетинелла ( <i>Abietinella abietina</i> )	54,8/6,8/37,7	3700	8000	2,2	0	29	71
Сфагнум ( <i>Sphagnum</i> )	58,1/7,0/33,2	1200	2000	1,7	2	21	77
<b>Лигнин флоэмы</b>							
Береза ( <i>Betula pendula</i> )	59,5/7,9/32,6	2200	4350	2,0	41	56	3

\* выход рассчитан от абсолютно сухого растительного сырья

## 2.5 Масс-спектрометрический анализ

Масс-спектры регистрировали с использованием гибридного масс-спектрометра QExactive Plus в режиме фотохимической ионизации при атмосферном давлении. Калибровку шкалы масс проводили в соответствии с рекомендацией производителя, используя раствор смеси стандартов Pierce (Thermo Scientific, США). Ввод раствора лигнина (5 мкл) с концентрацией 50 мг/л в смеси допант:вода (9:1) в источник ионов осуществляли в поток (200 мкл/мин) того же растворителя с помощью хроматографической системы LC-30 (Shimadzu, Япония),

состоящей из насоса, дегазатора и автосамплера. В качестве допантов использовали ацетон, диоксан и тетрагидрофуран. Масс-спектры записывали в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов в диапазоне  $m/z$  300–2000 путем усреднения результатов не менее чем 10 измерений и вычитания фонового сигнала растворителя. Использовали целевое значение заполнения ионной ловушки C-Trap (AGC)  $1 \times 10^6$ . Разметку пиков осуществляли при использовании порогового значения относительной интенсивности ( $I_{отн}$ ) 0,1%. Применяли оптимальные параметры ионного источника, обеспечивающие максимальную интенсивность масс-спектров исследуемого препарата лигнина и установленные в результате предварительных экспериментов: давление осушающего газа – 20, потоки распыляющего газа и газа завесы – 5 и 2 условных единицы соответственно, температура линии десольватации – 250 °С, температура испарителя – 500 °С, радиочастотное напряжение на S-линзе – 55 условных единиц.

Для получения тандемных масс-спектров использовали диссоциацию, активированную соударениями (ДАС) при повышенной энергии (HCD), в качестве газа для соударений использовали азот.

Управление масс-спектрометром, сбор и обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения Xcalibur (Thermo Scientific, США). Для определения элементных составов лигнинных олигомеров на основе их точных молекулярных масс использовали допустимое отклонение экспериментального значения  $m/z$  от расчетного на уровне 5 ppm и следующие ограничения по числу атомов элементов: С: 6–100, Н: 5–100, О: 1–100.

## 2.6 Спектроскопия ЯМР

Спектры ЯМР регистрировали при температуре 25 °С в 5 мм ампулах на спектрометре Bruker AVANCE III 600 (Bruker, Германия) с рабочей частотой для протонов 600 МГц. Около 80 мг лигнина растворяли в 0,5 мл ДМСО-d<sub>6</sub> и добавляли 0,1 мл раствора трисацетилацетоната хрома в ДМСО-d<sub>6</sub> (5 мг/мл) с целью уменьшения времени релаксации. Сигнал растворителя использовался в качестве внутреннего стандарта ( $\delta_C/\delta_H$  39,5 / 2,5 м.д.). Спектры ЯМР <sup>13</sup>С записывались с использованием последовательности «zgig30» (из стандартной библиотеки Bruker), обеспечивающей проведение количественного анализа и

сравнение интенсивностей сигналов. Использовались следующие параметры: ширина импульса 12 мкс; время задержки между импульсами – 2,0 с; число точек при накоплении – 64,000 и ~16,000 сканов, ширина спектра 238 м.д. Для записи двумерных спектров HSQC использовались следующие параметры: ширина спектров составила 15 м.д. и 238 м.д. в  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  измерениях соответственно. Число накоплений составляло 32 скана на одну точку с шагом  $1024 \times 256$ , время задержки между импульсами – 2,0 с. Интерпретация сигналов спектров проводилась по литературным данным, а также с помощью программного пакета ACD Spectrus Processor (ACD/Labs, Канада). Относительный количественный анализ на основе комбинации  $^{13}\text{C}$ -ЯМР и HSQC спектров проводили по методике, описанной в литературе [185]. Интегрирование сигналов осуществлялось с помощью программного обеспечения спектрометра «TopSpin 3.2».

## 2.7 Определение молекулярных масс

Среднечисловую и среднемассовую молекулярные массы, а также степень полидисперсности полученных препаратов лигнина определяли методом эксклюзионной хроматографии [77] с использованием ВЭЖХ системы LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), со спектрофотометрическим детектором SPD-20A. Разделение проводили при 40 °С на колонке для анализа водорастворимых полимеров MCX 300×8 мм с размером пор 1000 Å (PSS, Германия). Детектирование осуществляли при длине волны 275 нм. В качестве подвижной фазы и растворителя пробы использовали 0,1 М раствор гидроксида натрия. Градуировку системы проводили по стандартным монодисперсным образцам поли(стиролсульфоната) натрия (PSS, Германия).

## 2.8 Пиролитическая газовая хроматография/масс-спектрометрия

Для определения соотношения синрингильных (S) : гваяцильных (G) : *n*-гидроксифенильных (H) структур использовали метод пиролитической газовой хроматографии – масс-спектрометрии (Пиро-ГХ-МС) [25] с применением ГХ-МС системы GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония), оснащённой пиролизером EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония) с криоловушкой, охлаждаемой жидким азотом. Термическое разложение пробы проводили в среде гелия при температуре

450 °С в течение 30 с. Образующиеся продукты после криофокусирования подвергались разделению на колонке HP-5MS (Agilent, США), 30 м×0,25 мм, с толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий (1 мл/мин). Температура устройства ввода составляла 270 °С. Температурная программа термостата: линейный подъем от 40 до 340 °С в течение 30 мин. Детектирование производилось в режиме сканирования в диапазоне  $m/z$  15–400. Соотношение синрингильных, гваяцильных и *n*-гидроксифенильных структурных фрагментов определяли как соотношение сумм площадей хроматографических пиков идентифицируемых на хроматограмме мономерных фенолов указанных типов.

## 2.9 Элементный анализ

Элементный состав пробы определялся с использованием элементного анализатора EuroEA-3000 (EuroVector, Италия) методом сжигания анализируемой пробы в реакторе с последующим газохроматографическим разделением образующихся продуктов сгорания и катарометрическим детектированием. Анализируемую пробу предварительно взвешивали ( $m=0,1$  мг) и запечатывали в оловянные капсулы.

## 2.10 Нитробензольное окисление лигнина

В металлические автоклавы (объемом 2 мл) помещали 10 мг лигнина, заливали 1,4 мл 2М NaOH и добавляли 80 мкл нитробензола. Автоклав помещали в муфельную печь и выдерживали 2,5 часа при температуре 170 °С. По истечении времени выдерживания автоклав охлаждали и извлекали раствор. Для удаления нитробензола и продуктов его деструкции раствор экстрагировали  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 4 ч. Отделяли органический слой, после чего раствор продуктов окисления лигнина подкисляли HCl до pH 3-4 для отделения остатков непрореагировавшего лигнина. Снова проводили экстракцию  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  в течение 48 часов. Экстракт упаривали в токе азота. Осадок (мономерные фенольные продукты) растворяли в метаноле. Разделение продуктов нитробензольного окисления проводили в изократическом режиме на хроматографической колонке Zorbax Eclipse Plus C18, 3×150 мм, с размером зерна сорбента 3,5 мкм (Agilent, США). В качестве подвижной фазы использовали смесь воды и метанола (3:1) с добавкой 0,1%

муравьиной кислоты. Термостатирование хроматографической колонки осуществляли при 40 °С. Время анализа составляло 20 минут. Детектирование мономеров осуществляли при помощи диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 190–600 [186]. Идентификацию целевых продуктов нитробензольного окисления (4-гидроксибензальдегида, ванилина и сиреневого альдегида) проводили путем сравнения времен удерживания с временами удерживания их аналитических стандартов. Соотношение сирингильных, гваяцильных и гидроксифенильных единиц определяли путем сравнения площадей соответствующих хроматографических пиков.

### ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДА К АНАЛИЗУ ПРИРОДНЫХ ЛИГНИНОВ МЕТОДОМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ С ФОТОХИМИЧЕСКОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ ПРИ АТМОСФЕРНОМ ДАВЛЕНИИ<sup>1</sup>

#### 3.1 Механизм фотоионизации лигнина

Как показано в обзоре литературы, имеющиеся данные свидетельствуют о крайне слабой изученности вопросов, связанных с применением фотоионизации для получения высокоинформативных масс-спектров природных лигнинов. Для получения качественных масс-спектров необходимо оптимизировать условия фотохимической ионизации при атмосферном давлении и иметь представление об устойчивости ряда типов структур и связей характерных для макромолекул лигнина в условиях ФИАД.

В общем случае, генерация ионов аналитов в режиме ФИАД в ионном источнике может протекать по механизмам безразрядной химической ионизации (ионы образуются в газовой фазе из-за быстрого испарения молекул растворителя) [187], прямой фотоионизации при поглощении энергии УФ излучения непосредственно молекулами аналита, а также допированной фотоионизации при взаимодействии аналита с возбужденными молекулами растворителя (допанта) с энергией ионизации ниже энергии квантов УФ-излучения (<10 Эв). В связи с невысоким содержанием сильноокислых или способных легко протонироваться групп первый механизм вносит незначительный вклад в ионизацию лигнина. В отсутствие УФ излучения интенсивности сигналов как модельных соединений

---

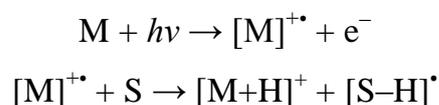
<sup>1</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

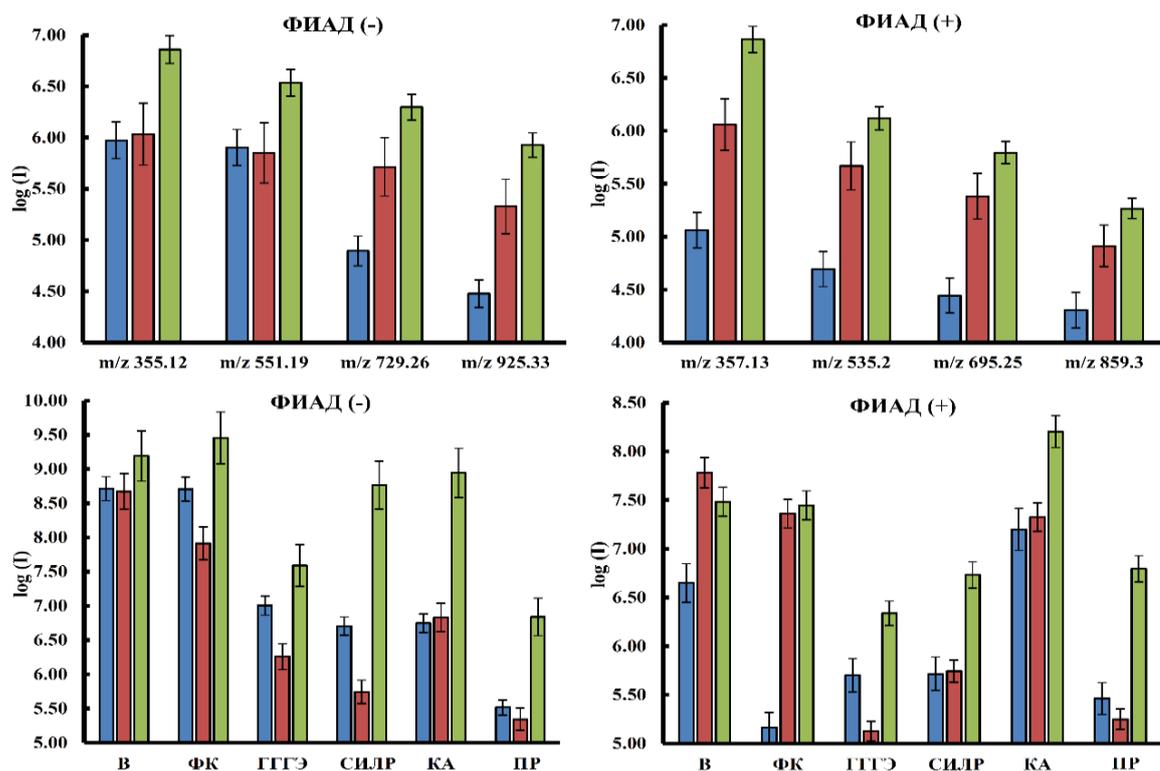
1. Kosyakov D.S., **Pikovskoi I.I.**, Ul'yanovskii N.V. Dopant-assisted atmospheric pressure photoionization Orbitrap mass spectrometry – an approach to molecular characterization of lignin oligomers // *Analytica Chimica Acta*. – 2021. – Vol. 1179. 338836, [DOI: 10.1016/j.aca.2021.338836](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338836) (Импакт-фактор Web of Science – 6.558, **Q1**), 50 %.

2. **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. Vol. 76. № 14. P. 1610–1617, [DOI: 10.1134/S1061934821140082](https://doi.org/10.1134/S1061934821140082) (Импакт-фактор Web of Science – 1.069, **Q4**)), 50%.

лигнина, так и его препаратов снижается примерно на два порядка как в ФИАД (+), так и в ФИАД (–) режимах. Для оценки роли прямой фотоионизации сравнивались интенсивности сигналов шести модельных соединений, а также ряда олигомеров из низкомолекулярных фракций лигнина, растворенных в метаноле, смеси ацетонитрила с водой (9:1) и диоксана с водой (9:1) при введении в ионный источник с потоком того же самого растворителя. Выбор данного перечня растворителей обосновывается следующим: метанол хорошо зарекомендовал себя при анализе лигнинов с применением электрораспыления; ацетонитрил с небольшой добавкой воды (10%) способен частично растворять лигнин; из-за низкой энергии ионизации диоксана (9,19 эВ), а также ацетона (9,4 эВ) и тетрагидрофурана (9,40 эВ) применительно к ФИАД данные растворители способствуют депротонированию или протонированию макромолекул лигнина за счет их вовлечения в ион-молекулярные реакции в газовой фазе, а добавление в состав небольшого количества воды (10%) способствует увеличению растворимости лигнина. Полученные результаты (рис. 12) показывают, что поглощение УФ-излучения непосредственно лигнинными олигомерами приводит к генерации значительных количеств как положительно, так и отрицательно заряженных ионов аналитов, при этом эффективность такого механизма ФИАД на порядок уступает процессам с участием допанта [188].

Исключением являются структуры, содержащие карбонильные и карбоксильные группы (ванилин, феруловая кислота) в режиме ФИАД (+), дающие сигналы протонированных молекул в среде ацетонитрил-вода, сопоставимые по интенсивности с получаемыми при использовании допанта. Примечательно, что при реализации прямой ФИАД (в среде неионизирующихся в условиях ФИАД метанола и водного ацетонитрила) в масс-спектрах модельных соединений и лигнинов не наблюдаются катион-радикалы, образующиеся при непосредственном взаимодействии аналитов с квантами электромагнитного излучения. Это говорит о протекании вторичных реакций обмена протоном с молекулами растворителя (S) по схеме [189, 190]:





**Рисунок 12.** Сравнение эффективности ионизации в режимах ФИАД (-) и ФИАД (+) для модельных соединений лигнина и ряда олигомеров с применением различных растворителей (синий – MeOH; красный – ацетонитрил/вода (90/10); зеленый – диоксан/вода (90/10).

В – ванилин; ФК – феруловая кислота; КА – кониферилловый альдегид.

Альтернативным вариантом является фотоионизация кластеров молекул метанола или ацетонитрила (в том числе с участием воды), обладающих пониженным потенциалом ионизации ( $< 10$  эВ) [191], приводящая к образованию как протондонорных, так и протонакцепторных реакционноспособных частиц (в том числе  $O_2^-$ ), взаимодействующих с молекулами аналитов. Данный механизм объясняет образование депротонированных молекул  $[M-H]^-$ , наблюдаемых в масс-спектрах ФИАД наряду с ионами  $[M+H]^+$ . Еще одним важным механизмом образования  $[M-H]^-$  может являться протолитическая диссоциация молекул фенолов в результате фотоионизации, приводящего к возрастанию кислотности фенольной группы на 3–9 порядков [192].

Использование апротонных растворителей с низким потенциалом ионизации в смесях с водой ожидается приводит к повышению эффективности генерации множества положительно и отрицательно заряженных частиц различных типов

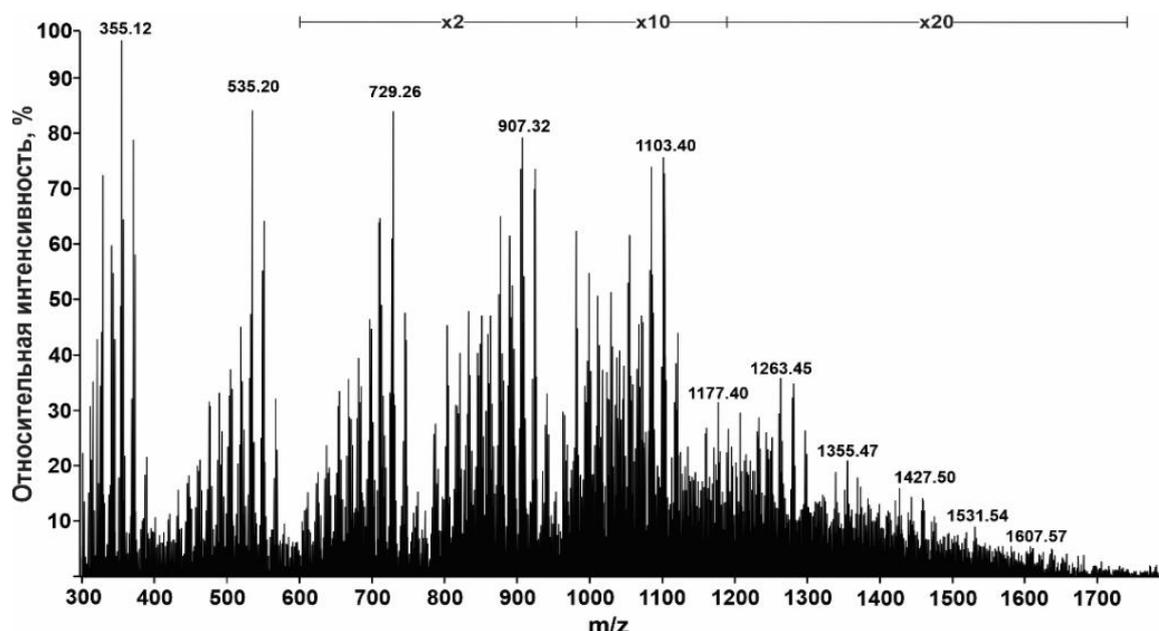
[193, 194] за счёт энергии излучения криптоновой лампы с последующим протонированием/депротонированием молекул аналитов. При этом, для исследуемых модельных соединений эффективность ФИАД (-) оказалась существенно (до 2 порядков) выше по сравнению с ФИАД (+) благодаря наличию в их структуре групп с протолитическими свойствами и высоким сродством допантов к протону.

Дальнейшие исследования сконцентрированы на применении допантов, в качестве которых использовали ацетон, диоксан и тетрагидрофуран.

### 3.2 Влияние природы допанта на эффективность ионизации

Эффективность ионизации аналитов в значительной степени зависит от растворителя, который должен обеспечивать диссоциацию фенольных гидроксильных групп в газовой фазе. В качестве таких растворителей были опробованы ацетон, диоксан и тетрагидрофуран.

Масс-спектры лигнина, получаемые при использовании данных растворителей, характеризуются высокой сложностью и содержат тысячи ионизированных молекул, которые объединяются в группы с разной степенью полимеризации (рис. 13). При этом общая структура спектров лигнина остается схожей при использовании различных растворителей (табл. 6).



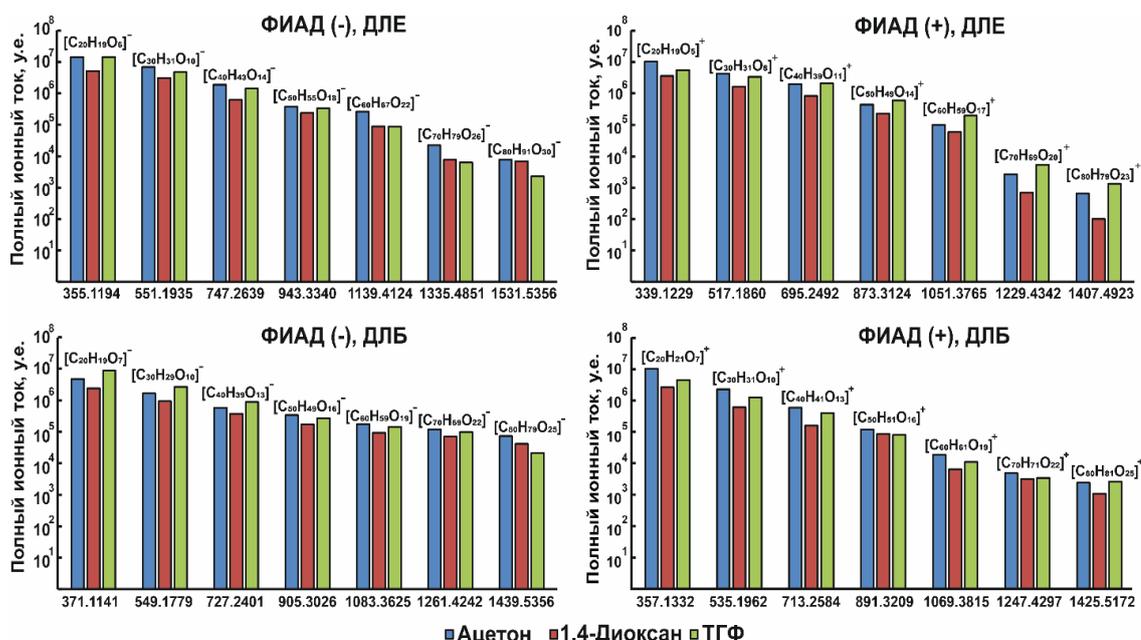
**Рисунок 13.** Масс-спектр препарата диоксанлигнина ели, полученный в режиме ФИАД (-) с использованием 1,4-диоксана в качестве допанта

**Таблица 6.** Структура масс-спектров ДЛЕ с применением различных растворителей в режиме ФИАД (-) и ФИАД (+)

Растворитель	группы пиков ( <i>m/z</i> диапазон), с разной степенью полимеризации (n)						
	n=2	n=3	n=4	n=5	n=6	n=7	n=8
<b>ФИАД (-)</b>							
Диоксан	250-420	400- 620	620- 780	780- 980	980- 1150	1150- 1300	1300- 1500
Ацетон	250-420	400- 580	580- 760	760- 950	950- 1150	1150- 1300	1300- 1500
ТГФ	250-420	400- 580	580- 760	760- 950	950- 1150	1150- 1300	1300- 1500
<b>ФИАД (+)</b>							
Диоксан	250-380	380- 580	580- 740	740- 900	900- 1150	1100- 1250	1250- 1500
Ацетон	250-390	390- 580	580- 740	740- 900	900- 1150	1100- 1220	1220- 1500
ТГФ	250-390	390- 580	580- 750	750- 900	900- 1150	1100- 1250	1250- 1500

Для сравнения эффективности ионизации лигнина с применением трех допантов в режимах генерации положительно и отрицательно заряженных ионов был выбран ряд интенсивных пиков олигомеров в масс-спектрах диоксанлигнина ели (ДЛЕ), различающихся по массе на 196 Да, и ряд олигомеров в масс-спектрах диоксанлигнина березы (ДЛБ), различающихся на 178 Да. Данные по интенсивности ионов показывают схожесть в значениях сигналов в спектрах на разных молекулярных массах аналитов, которые достигают 1500 Да, с применением ацетона, диоксана и ТГФ (рис. 14).

В случае генерации положительно заряженных ионов применение ТГФ позволило получить наиболее интенсивные сигналы в области высоких масс по сравнению с двумя другими допантами.



**Рисунок 14.** Сравнение интенсивностей пиков олигомеров лигнина в масс-спектрах диоксанлигнина ели (ДЛЕ) и березы (ДЛБ), полученных с использованием в качестве допантов ацетона, диоксана и тетрагидрофурана

Количество пиков в наблюдаемых масс-спектрах ДЛЕ и ДЛБ, которые были получены с использованием трех допантов, указывают на небольшое преимущество диоксана (табл. 7) если рассматривать наиболее интенсивные пики (с относительной интенсивностью  $>1\%$ ,  $N_{1\%}$ ) в случае регистрации отрицательно заряженных ионов. В режиме регистрации положительных ионов предпочтение можно отдать тетрагидрофурану.

**Таблица 7.** Значения молекулярных масс ( $M_n$ ) и количества пиков ( $N$ ) с различной интенсивностью по масс-спектрометрическим данным

Параметр	Ацетон		Диоксан		ТГФ	
	ФИАД (-)	ФИАД (+)	ФИАД (-)	ФИАД(+)	ФИАД (-)	ФИАД (+)
<b>Лигнин ели</b>						
$M_n$ (Да)	650	610	700	520	620	540
$N_{1\%}$	1559	1089	1743	980	960	1321
$N_{0.1\%}$	2682	2167	2666	1820	2467	2446
<b>Лигнин березы</b>						
$M_n$ (Да)	600	460	620	470	590	460
$N_{1\%}$	1650	840	1764	770	1100	920
$N_{0.1\%}$	3090	1410	2890	1580	2100	1620

Разница в средних значениях молекулярных масс ( $M_n$ ), рассчитанных для диоксанлигнина березы и ели на основе масс-спектрометрических данных, полученных с применением разных допантов, незначительна. Тем не менее, полученные абсолютные величины  $M_n$  оказались в 2–3 раза ниже по сравнению с результатами анализа методом эксклюзионной хроматографии (1500-2000 Да), что представляется проблемой для изучения молекулярно-массовых распределений лигнина с масс-спектрометрическими методами. Данное обстоятельство, тем не менее, не является препятствием для применения масс-спектрометрии в решении задач сравнения образцов лигнинов по их молекулярным массам и отслеживания тенденций изменения молекулярно-массовых распределений биополимера в ходе различных процессов.

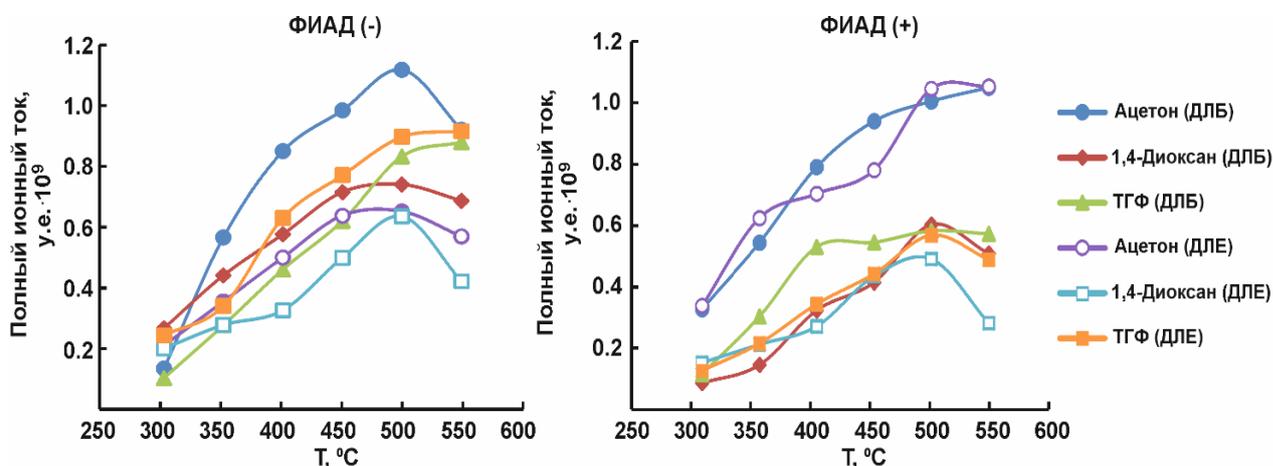
На предварительном этапе работы по выбору допантов установлено, что ацетон, диоксан и ТГФ обладают близкой эффективностью ионизации лигнина. Все три допанта применимы для работы в режиме ФИАД, как в режиме генерации отрицательно заряженных, так и положительно заряженных ионов.

### **3.3 Оптимизация параметров ионного источника**

На предварительном этапе (*пункт 3.1*) эксперимента установлено, что основной вклад в эффективность ионизации вносят ион-молекулярные реакции в газовой фазе между лигнином и ионами допанта, которые образуются под воздействием квантов излучения криптоновой лампы. Для получения наиболее интенсивных масс-спектров изучено влияние на эффективность ионизации следующих параметров: температуры ионного источника, как фактора определяющего энергию взаимодействия аналитов с допантом и процесса переноса протона, скорости потока растворителя в источник, так как процесс фотоионизации зависит от потока массы аналитов в ионный источник; а также потока распыляющего газа. Эксперименты проводились на образцах диоксанлигнина, выделенного из древесины ели (ДЛЕ) и березы (ДЛБ).

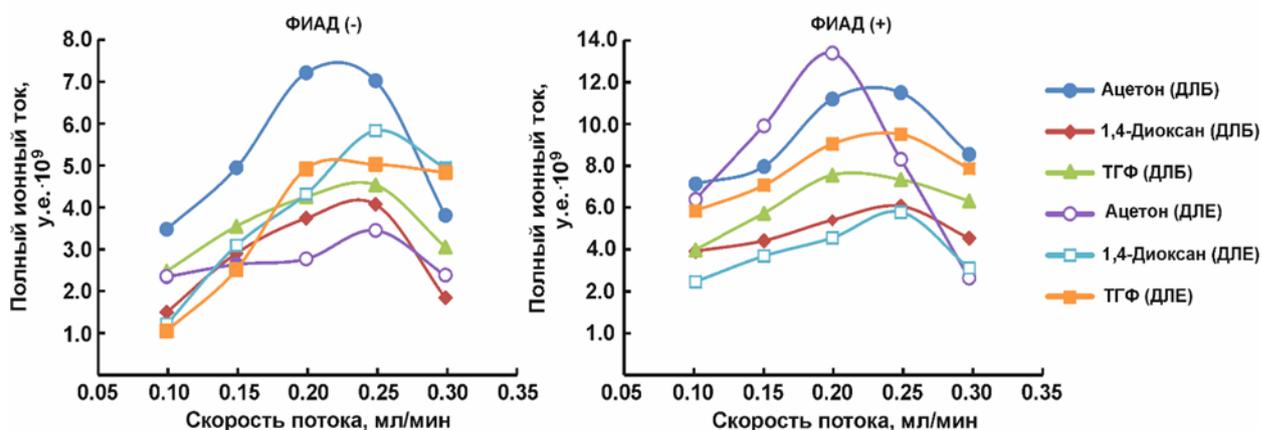
Температуру источника варьировали в пределах 300–550 °С (рис. 12), скорость потока – от 0,10 до 0,30 мл/мин (рис. 15). Для всех допантов характерно увеличение интенсивности сигналов с ростом температуры источника до 500 °С. Дальнейший нагрев до 550 °С не приводит к значительному увеличению полного

ионного тока и, в некоторых случаях, вызывают его снижение из-за развития процессов разложения лигнина в ионном источнике.



**Рисунок 15.** Зависимости полного ионного тока от температуры источника с использованием различных допантов

Поскольку эффективность ФИАД с добавлением допанта зависит от скорости переноса протона между аналитом и допантом (растворителем), интенсивность сигналов протонированных / депротонированных молекул аналита существенно зависит от концентрации реагентов в газовой фазе и, следовательно, количества легирующей примеси, подаваемой в ионный источник. Этот фактор ответственен за наблюдаемые близкие к линейному росту значения величины сигнала лигнина с увеличением скорости потока подвижной фазы до 200 мкл/мин (рис. 16).



**Рисунок 16.** Зависимости полного ионного тока от скорости потока с использованием различных допантов

Независимо от используемого допанта, при высоких скоростях потока (> 200–250 мкл/мин) наблюдается существенное снижение эффективности ионизации. Подобный эффект был описан ранее в литературе и связан с рекомбинацией ионов и кластеризацией молекул допанта, что приводит к снижению их способности участвовать в реакции переноса протона [195]. Полученные оптимальные параметры ионного источника для ФИАД с применением различных допирующих агентов представлены в таблице 8.

**Таблица 8.** Оптимальные параметры температуры ионного источника и скорости потока для генерации положительно или отрицательно заряженных ионов для различных допантов

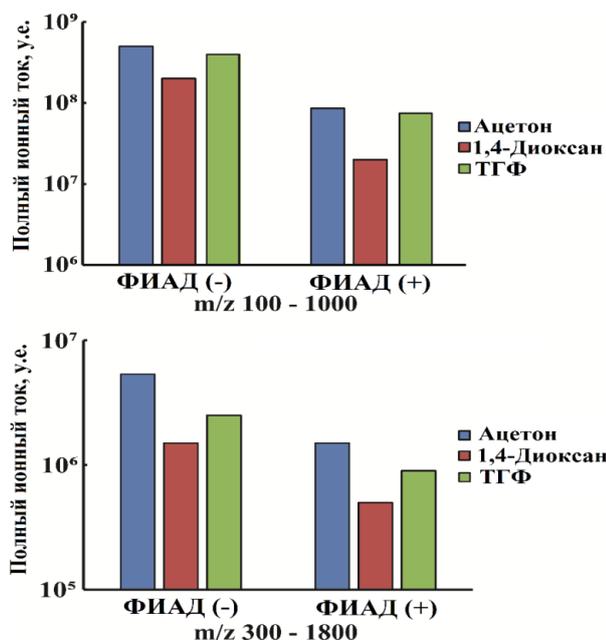
Допант	Режим	Скорость потока, мл/мин	Температура, °С
Ацетон	ФИАД (-)	0,20	500
	ФИАД (+)	0,20	500
Диоксан	ФИАД (-)	0,25	500
	ФИАД (+)	0,25	500
ТГФ	ФИАД (-)	0,25	550
	ФИАД (+)	0,25	550

Сравнение значений полного ионного тока, полученных в оптимальных условиях при использовании трех допантов (рис. 12, 13) продемонстрировало, что ацетон, 1,4-диоксан и ТГФ характеризуются сопоставимыми эффективностями генерации как положительно, так и отрицательно заряженных ионов лигнина, хотя ацетон и ТГФ несколько превосходят 1,4-диоксан. С точки зрения эффективности используемые допанты могут быть расположены в следующих последовательностях: 1,4-диоксан > ТГФ ~ ацетон (режим регистрации положительно заряженных ионов) и 1,4-диоксан > ТГФ > ацетон (режим регистрации отрицательно заряженных ионов). Для изучения влияния молекулярной массы лигнина на эффективность ФИАД был использован предложенный нами ранее подход, основанный на сравнении интенсивностей сигналов ряда олигомеров, различающихся только по степени полимеризации [130]. Димеры и октамеры с высокой интенсивностью пиков в масс-спектрах, различающиеся количеством типичных фенилпропановых звеньев с элементными составами  $C_{10}H_{10}O_3$  (178,0632 Да) или  $C_{10}H_{12}O_4$  (196,0741 Да) были выбраны в

качестве тестовых компонентов в ДЛБ и ДЛЕ. Полученные результаты (рис. 12) хорошо согласуются с представленными выше данными о влиянии природы допанта на значения полного ионного тока олигомеров лигнина и демонстрируют незначительное перераспределение эффективности допирующих агентов с увеличением степени полимеризации олигомеров лигнина. Примечательно, что подавление сигналов более крупных олигомеров в режиме ФИАД (+) по сравнению с ФИАД (-) наблюдался для обоих исследуемых лигнинов. Таким образом, соотношение интенсивностей пиков октамера и димера в ФИАД (+) оказалось на порядок ниже, чем в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов, что предполагает очевидное преимущество ФИАД (-) при исследовании высокомолекулярных фракций лигнина ( $> 1000$  Да).

При сравнении допирующих добавок помимо эффективности ионизации лигнина важным фактором является уровень собственного фонового сигнала допанта в масс-спектрах. Последний может повлиять на чувствительность анализа и создать трудности в характеристике химического состава лигнинов. В этом отношении, независимо от диапазона  $m/z$  и режима ионизации 1,4-диоксан имеет очевидное преимущество (рис. 17). Значение фонового сигнала для этого растворителя оказалось в 1,5–5,5 раза ниже, чем у ацетона и ТГФ. Следует отметить, что интенсивные сигналы примесей наблюдаются при  $m/z < 300$ , в то время как в области, наиболее важной для изучения лигнинов ( $m/z 300–2000$ ), вклад допанта в фоновый сигнал образцов лигнина незначителен.

Таким образом в качестве рекомендуемого допанта предлагается использовать смесь диоксан:вода (90:10), обладающую, с одной стороны, высокой эффективностью ионизации лигнина, а с другой стороны – наиболее низким фоновым сигналом в масс-спектре. Дальнейшие исследования (главы 4-6) проводили с применением данного допанта.



**Рисунок 17.** Уровень фонового сигнала различных допантов

### 3.4 Оптимизация величины спектрального разрешения

Важнейшим параметром, определяющим возможность детектирования максимального количества ионов изобарных соединений, а также правильность определения элементных составов компонентов сложного объекта, является разрешающая способность масс-анализатора (спектральное разрешение). Для Orbitrap-анализаторов эта величина может варьироваться в широких пределах и определяется временем нахождения ионов в орбитальной ловушке и скоростью регистрации масс-спектра.

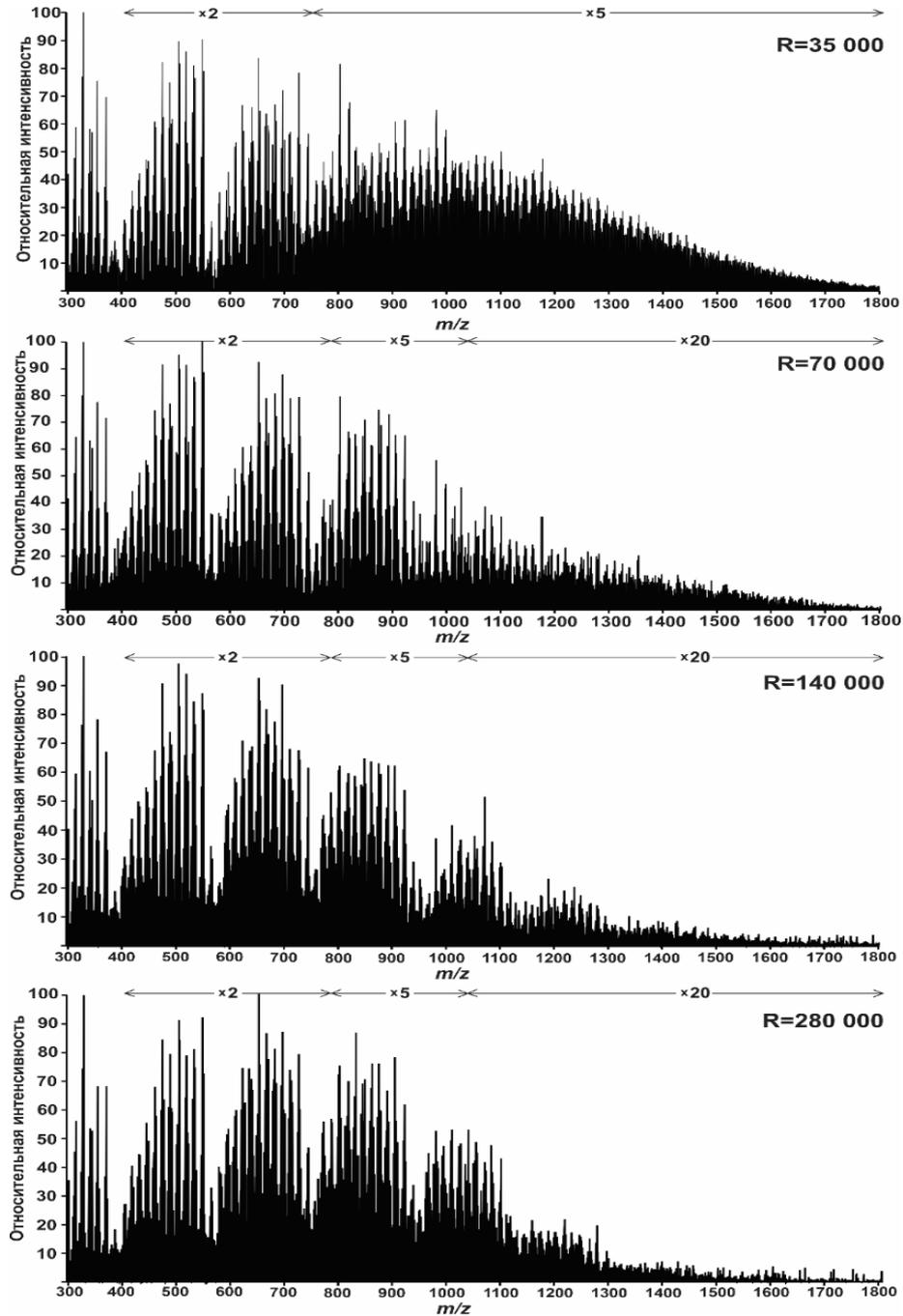
На рисунке 18 представлены масс-спектры диоксанлигнина древесины кедра, полученные на различных уровнях разрешающей способности масс-анализатора  $R$  (здесь и далее приводится номинальная величина, определяемая при  $m/z$  200, реальная величина разрешающей способности уменьшается пропорционально квадратному корню из  $m/z$ ). Как и в случае лигнинов других хвойных пород деревьев, для исследуемого препарата характерно наличие в масс-спектрах ярко выраженных групп пиков, отстоящих друг от друга на величину 190–200 Да, соответствующую гваяцилглицериновой структурной единице макромолекул лигнина ( $C_{10}H_{12}O_4$ ) с массой 196,0741 Да. Каждая группа пиков относится к олигомерам с различной степенью полимеризации ( $n$ ) – от димеров до декамеров. Данная картина прослеживается для всех полученных масс-спектров, однако в

случае  $R = 35\ 000$  и ниже, фракция более крупных олигомеров ( $n \geq 5$ ) детектируется как широкий «горб» с потерей указанной структуры спектра, охватывающий диапазон масс от 0,9 до 2 кДа. Разрешающая способность на уровне 70 000 является минимальной, при которой прослеживается дифференциация олигомеров лигнина по степени полимеризации, при этом наиболее структурированные масс-спектры могут быть получены при  $R \geq 140\ 000$ .

Следует отметить понижение относительной интенсивности сигналов в области больших масс ( $> 1300$  Да) с ростом разрешающей способности масс-анализатора. Так, при  $R \geq 140\ 000$  сигналы ионов с  $m/z > 1600$  практически отсутствуют в масс-спектрах, при этом величина общего ионного тока в диапазоне величин  $R$  от 70 000 до 280 000 остаётся практически постоянной, но в  $\sim 2$  раза ниже, чем при значении разрешающей способности, равном 35 000. Данный факт является весьма примечательным, поскольку свидетельствует о возможности частичной фрагментации крупных молекул олигомеров лигнина в квадрупольной (С-ловушке) или орбитальной ловушках анализатора. Повышение спектрального разрешения достигается пропорциональным увеличением времени нахождения пакета ионов в ловушке, которое для используемого масс-спектрометра достигает  $\sim 1$  с при максимальном разрешении, и соответственно, сопровождается ростом вероятности соударений с остаточными молекулами газа. Естественно, соударительной фрагментации в первую очередь должны подвергаться наиболее слабые в структуре лигнина простые эфирные алкил-арильные ( $\beta$ -О-4) связи, разрыв которых приводит к частичной деполимеризации лигнина.

Тонкая структура масс-спектров лигнина (рис. 19) представлена в основном кластерами пиков изобарных ионов, отличающихся по массе на 36,5 мДа. Данная величина обусловлена наличием серий олигомеров, отличающихся 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) или величину  $\Delta m/z$  соответствующих пиков в масс-спектре, равную 0,0153 ( $4 \times 12,0000 - 3 \times 15,9949$ ). Такие пары формируются, по-видимому, «добавлением» четырех

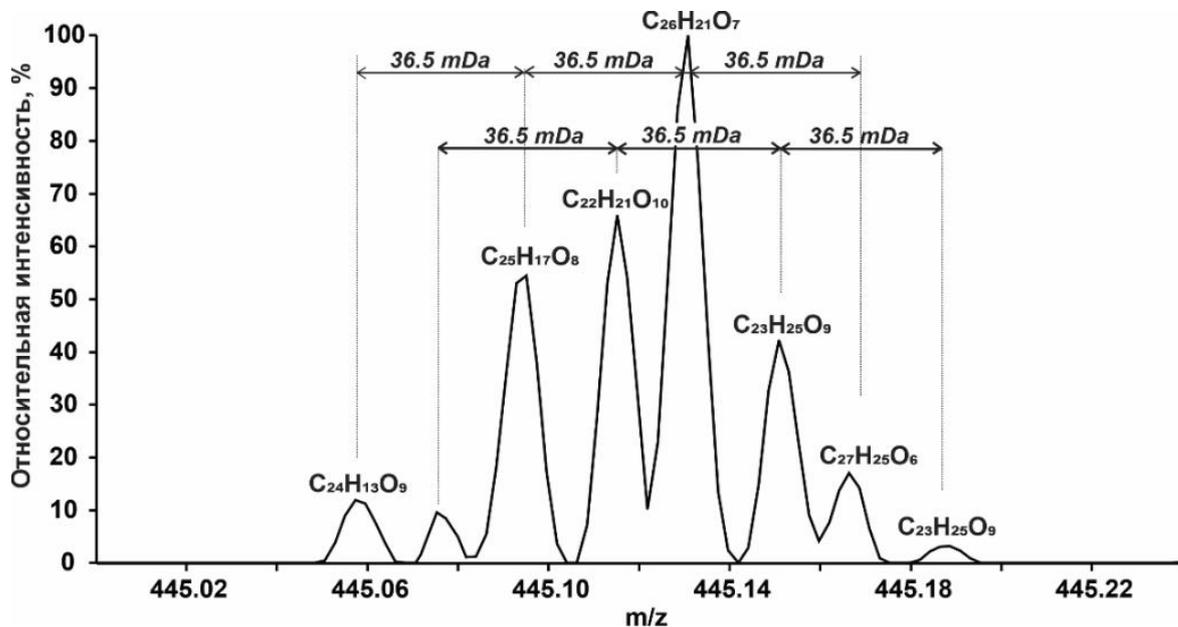
метильных групп (удлинение боковых цепей, метоксилирование фенольных гидроксильных групп) с одновременной «потерей» трех гидроксильных групп и образованием четырех двойных связей.



**Рисунок 18.** ФИАД масс-спектры диоксанлигнина древесины кедрa, полученные при различных величинах разрешающей способности масс-анализатора.

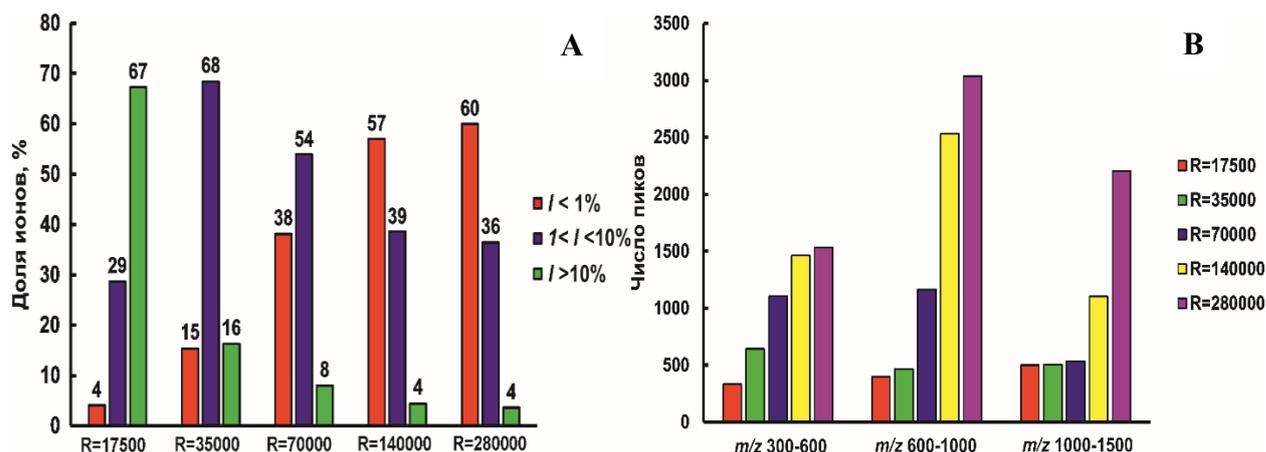
Понимание тонкой структуры кластеров изобарных ионов позволяет оценить величину  $R$ , необходимую для их дискриминации в масс-спектре. Для молекулярной массы 1 кДа спектральное разрешение ( $M/\Delta M$ ) для пар пиков с  $\Delta m/z$

0,0365 и 0,0153 должно составлять  $\sim 30\ 000$  и  $\sim 70\ 000$  соответственно. Учитывая зависимость разрешающей способности масс-анализаторов на основе орбитальной ионной ловушки от величины  $m/z$ , приведённые значения соответствуют  $R = 70\ 000$  и  $R = 140\ 000$  ( $m/z\ 200$ ).



**Рисунок 19.** Фрагмент тонкой структуры масс-спектра хвойного лигнина ( $R=70\ 000$ )

Закономерно, что с увеличением спектрального разрешения общее количество детектируемых пиков в масс-спектре лигнина возрастает с 1200 при  $R = 17500$  до 6800 при  $R = 280\ 000$  (рис. 20 В) за счет дискриминации изобарных ионов. Естественно, эффект наиболее выражен для высоких молекулярных масс – если в диапазоне  $m/z$  300–600 увеличение  $R$  с 70 000 до 280 000 не оказывает значительного влияния на число детектируемых пиков, то при  $m/z > 1\ 000$  наблюдается прямо пропорциональное увеличение числа обнаруживаемых лигнинных олигомеров с ростом разрешающей способности масс-спектрометра в том же диапазоне. Основной вклад в прирост общего количества пиков вносят низкоинтенсивные пики с  $I < 1\ %$  (рис. 20А), а доля пиков с относительными интенсивностями от 1 до 100 % снижается. При увеличении  $R$  от 140 000 до 280 000 распределение пиков по интенсивности практически не меняется, несмотря на заметный рост общего числа детектируемых олигомеров.



**Рисунок 20.** Распределение ионов, детектируемых при различной разрешающей способности масс-анализатора на основе орбитальной ионной ловушки, по интенсивности (А) и числу сигналов (В) в масс-спектре лигнина

Сравнение результатов определения элементных составов олигомеров лигнина на различных уровнях разрешающей способности масс-анализатора показало, 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  $R \geq 70\,000$  (табл. 9). Учитывая приведённые выше данные по влиянию разрешения на число детектируемых пиков, величина  $R = 70\,000$  может считаться минимально необходимой для быстрой характеристики важнейших (наиболее интенсивных) компонентов препаратов лигнина в масс-спектре, а также изучения его низкомолекулярных фракций и продуктов деполимеризации с молекулярными массами менее 600–700 Да.

**Таблица 9.** Сравнение точных масс и брутто-формул изобарных депротонированных молекул лигнинных олигомеров с различной степенью полимеризации, полученных на разных уровнях разрешающей способности масс-анализатора ( $R$ )

$R$	Димеры ( $m/z$ 329)		Тримеры ( $m/z$ 549)	
	$m/z$	$[M-H]^-$	$m/z$ , Да	$[M-H]^-$
35 000	329,1043	$C_{18}H_{17}O_6$	549,1801	$C_{23}H_{33}O_{15}$
	329,0686	$C_{17}H_{13}O_7$		
70 000	329,1035	$C_{18}H_{17}O_6$	549,1772	$C_{30}H_{29}O_{10}$
	329,0671	$C_{17}H_{13}O_7$	549,1407	$C_{29}H_{25}O_{11}$
140 000	329,1036	$C_{18}H_{17}O_6$	549,1773	$C_{30}H_{29}O_{10}$
	329,0673	$C_{17}H_{13}O_7$	549,1562	$C_{33}H_{25}O_8$
	329,0462	$C_{20}H_9O_5$	549,1409	$C_{29}H_{25}O_{11}$
	329,0309	$C_{16}H_9O_8$	549,1197	$C_{32}H_{21}O_9$

<b>280 000</b>	329,1035	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	549,1772	C <sub>30</sub> H <sub>29</sub> O <sub>10</sub>
	329,0672	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	549,1561	C <sub>33</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub>
	329,0461	C <sub>20</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	549,1409	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>
	329,0309	C <sub>16</sub> H <sub>9</sub> O <sub>8</sub>	549,1198	C <sub>32</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>
<b>35 000</b>	<b>Тетрамеры (m/z 727)</b>		<b>Пентамеры (m/z 905)</b>	
	727,2468	C <sub>33</sub> H <sub>43</sub> O <sub>18</sub>	905,3082	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> O <sub>21</sub>
<b>70 000</b>	727,2408	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> O <sub>13</sub>	905,3076	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> O <sub>21</sub>
	727,2068	C <sub>32</sub> H <sub>39</sub> O <sub>19</sub>	305,2650	C <sub>49</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub>
<b>140 000</b>	727,2408	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> O <sub>13</sub>	905,3067	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> O <sub>21</sub>
	727,2232	C <sub>36</sub> H <sub>39</sub> O <sub>16</sub>	905,2889	C <sub>46</sub> H <sub>49</sub> O <sub>19</sub>
	727,2051	C <sub>39</sub> H <sub>35</sub> O <sub>14</sub>	905,2687	C <sub>49</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub>
	727,1842	C <sub>42</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub>	905,2483	C <sub>45</sub> H <sub>45</sub> O <sub>20</sub>
<b>280 000</b>	727,2405	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> O <sub>13</sub>	905,3055	C <sub>50</sub> H <sub>49</sub> O <sub>16</sub>
	727,2189	C <sub>43</sub> H <sub>35</sub> O <sub>11</sub>	905,2845	C <sub>46</sub> H <sub>49</sub> O <sub>19</sub>
	727,2041	C <sub>39</sub> H <sub>35</sub> O <sub>14</sub>	905,2687	C <sub>49</sub> H <sub>45</sub> O <sub>17</sub>
	727,1828	C <sub>42</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub>	905,2483	C <sub>45</sub> H <sub>45</sub> O <sub>20</sub>
<b>35 000</b>	<b>Гексамеры (m/z 1101)</b>		<b>Гептамеры (m/z 1235)</b>	
	1101,380	C <sub>78</sub> H <sub>53</sub> O <sub>7</sub>	1235,429	C <sub>72</sub> H <sub>67</sub> O <sub>19</sub>
<b>70 000</b>	1101,381	C <sub>53</sub> H <sub>65</sub> O <sub>25</sub>	1235,420	C <sub>61</sub> H <sub>71</sub> O <sub>27</sub>
<b>140 000</b>	1101,382	C <sub>53</sub> H <sub>65</sub> O <sub>25</sub>	1235,415	C <sub>43</sub> H <sub>79</sub> O <sub>40</sub>
	1101,344	C <sub>77</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub>	1235,419	C <sub>61</sub> H <sub>71</sub> O <sub>27</sub>
<b>280 000</b>	1101,381	C <sub>53</sub> H <sub>65</sub> O <sub>25</sub>	1235,453	C <sub>87</sub> H <sub>63</sub> O <sub>8</sub>
	1101,360	C <sub>56</sub> H <sub>61</sub> O <sub>23</sub>	1235,417	C <sub>86</sub> H <sub>59</sub> O <sub>9</sub>
	1101,343	C <sub>77</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub>	1235,381	C <sub>85</sub> H <sub>55</sub> O <sub>10</sub>

### 3.5 Характеристика фрагментации модельных соединений

Изучение процессов фрагментации макромолекул лигнина в ионном источнике является важной составляющей оценки применимости метода ФИАД-МСВР для структурного анализа лигнинов. Проведение исследований в режиме ФИАД на модельных соединениях позволило изучить поведение важнейших функциональных групп лигнина, таких как альдегидная (кониферилловый альдегид, сиреневый альдегид), карбоксильная (феруловая кислота), карбонильная (ванилин, ацетованилон), фенольная и спиртовая гидроксильные группы. Использование в эксперименте димерных соединений позволило охарактеризовать устойчивость таких распространенных в лигнине связей, как простая эфирная ( $\beta$ -гваяциловый эфир гваяцилглицерина), углерод-углеродные (секоизоларицирезинол, дигидродегидродиизоэвгенол, пинорезинол). Структуры данных соединений представлены в разделе 2.3 (рис. 11).

Анализ масс-спектров мономерных соединений в режиме генерации отрицательно заряженных ионов в оптимальных условиях показал, что основные пути фрагментации связаны с реакцией отщепления метильной группы с образованием анион радикала  $[M-CH_3]^-$  (табл. 10). Данный процесс несколько необычен, так как уходящая метильная группа не может нести положительного заряда. Вероятно, в процессе ионизации аналита происходит захват электрона с образованием отрицательного молекулярного иона, от которого в дальнейшем будет отщепляться метильный радикал. Депротонированная молекула изоэвгенола проявляет наибольшую тенденцию к фрагментации в ионном источнике - относительные интенсивности пиков  $[M-CH_3]^-$  и  $[M-CH_4]^-$  достигают 12 и 23% соответственно. Для режима ФИАД (+) характерно отщепление воды, формальдегида, а также CO от карбонилсодержащих соединений, а также удаление CO<sub>2</sub> из феруловой кислоты (табл. 11). Последняя является наименее стабильным в условиях ФИАД соединением, для которого сигнал протонированной молекулы не является доминирующим в масс-спектре. В отличие от ФИАД (-), в режиме регистрации положительно заряженных ионов фрагментация в источнике сильно зависит от природы допанта. Например, только использование 1,4-диоксана приводит к отщеплению этилена от пропановой цепи изоэвгенола, в то время как ацетон и ТГФ избирательно способствуют деградации кониферилового альдегида и ацетованилона соответственно.

**Таблица 10.** Масс-спектры модельных мономерных соединений, полученных с различными допантами в режиме генерации отрицательно и положительно заряженных ионов в оптимальных условиях

Модельное соединение	Ион	$m/z$	$I_{отн}, \%$		
			Ацетон	Диоксан	ТГФ
<b>ФИАД-МС (-)</b>					
Изоэвгенол	$[M-H]^-$	163,0763	100	100	100
	$[M-CH_3]^-$	149,0607	8	12	10
	$[M-H-CH_3]^-$	148,0529	12	15	13
	$[M-C_3H_7]^-$	121,0296	5	6	5
Кониферильный альдегид	$[M-H]^-$	177,0556	100	100	100
	$[M-H-CH_3]^-$	162,0322	7	6	7

Сиреневый альдегид	$[M-H]^-$	181,0505	100	100	100
	$[M-H-CH_3]^-$	166,0271	4	5	6
Феруловая кислота	$[M-H]^-$	193,0503	100	100	100
	$[M-CH_3]^-$	179,0350	2	3	2
	$[M-H-CO_2]^-$	149,0607	4	5	2
	$[M-C_2H_4O_2]^-$	134,0374	3	1	2
Ацетованилон	$[M-H]^-$	165,0557	100	100	100
	$[M-H-CH_3]^-$	150,0322	11	10	12
Ванилин	$[M-H]^-$	151,0400	100	100	100
	$[M-H-CH_3]^-$	136,0166	15	13	13
<b>ФИАД-МС (+)</b>					
Изоэвгенол	$[M+H]^+$	165,0909	100	100	100
	$[M+H-C_2H_4]^+$	139,0599	0	20	0
Кониферилловый альдегид	$[M+H]^+$	179,0705	100	100	100
	$[M+H-H_2O]^+$	161,0596	14	2	2
Сиреневый альдегид	$[M+H]^+$	183,0653	100	100	100
	$[M+H-CO]^+$	155,0702	20	5	10
Феруловая кислота	$[M+H]^+$	195,0656	82	100	83
	$[M+H-H_2O]^+$	177,0550	100	96	35
	$[M+H-CH_2O]^+$	165,0547	23	21	25
	$[M+H-CO_2]^+$	151,0757	32	30	100
Ацетованилон	$[M+H]^+$	167,0703	100	100	100
	$[M+H-CH_2O]^+$	137,0602	6	6	53
Ванилин	$[M+H]^+$	153,0541	100	100	100

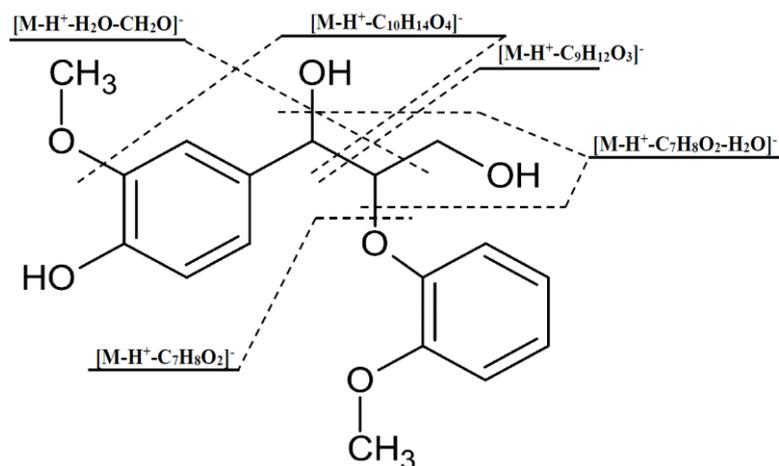
Анализ масс-спектров димерных соединений показал наличие фрагментных ионов, соответствующих расщеплению связей между мономерными структурными единицами лигнина (табл. 11, 12).

**Таблица 11.** Масс-спектры модельных димерных соединений, полученных с различными допантами в режиме генерации отрицательно заряженных ионов

Модельное соединение	Ион	$m/z$	$I_{\text{отн}}, \%$		
			Ацетон	Диоксан	ТГФ
ГЭГГ	$[M-H]^-$	319,1187	35	53	26
	$[M-H-H_2O-CH_2O]^-$	271,0976	100	100	100
	$[M-C_9H_{13}O_3]^-$	151,0400	80	76	89
	$[M-C_9H_{15}O_3]^-$	149,0241	5	22	31
	$[M-C_{12}H_{15}O_3]^-$	121,0295	19	23	23

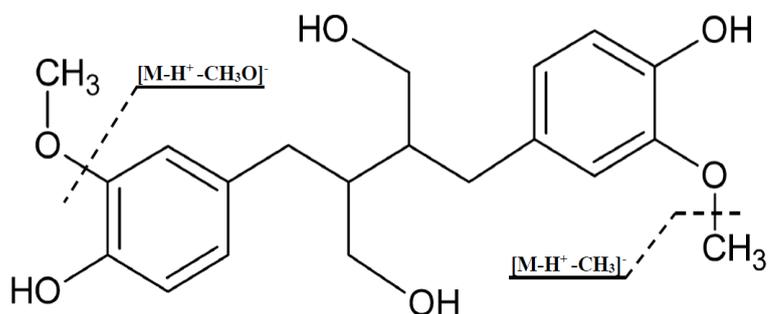
СИЛР	$[M-H]^-$	361,1657	100	100	100
	$[M-H-CH_4]^-$	345,1346	15	6	8
	$[M-H-CH_3OH]^-$	329,1395	12	7	10
ДДДЭ	$[M-H]^-$	327,1601	100	100	100
	$[M-H-CH_4]^-$	311,1291	22	5	8
	$[M-C_2H_7]^-$	297,1134	4	2	6
ПР	$[M-H]^-$	357,1356	50	100	31
	$[M-H-CH_4]^-$	341,1031	72	13	25
	$[M-C_8H_{11}O_3]^-$	203,0714	10	8	20
	$[M-C_{10}H_{13}O_3]^-$	177,0562	18	7	15
	$[M-C_{12}H_{15}O_3]^-$	151,0400	100	71	100

Как и можно было ожидать, наибольшей фрагментации подвержена простая эфирная G( $\beta$ -O-4)G связь в структуре ГЭГГ, которая является наиболее слабой в структуре лигнина. Относительная интенсивность сигнала исходной депротонированной молекулы составляет около 35% при допировании ацетоном или 1,4-диоксаном, более низкое значение (25%) характерно для ТГФ (табл. 11). Исходя из компонентного состава образующихся фрагментных ионов можно утверждать, что основные пути фрагментации в димере связаны с процессами дегидратации, деметоксилирования и разрыву  $\beta$ -O-4 связи, с высвобождением отдельных мономерных составляющих (наблюдаемый в масс-спектре интенсивный сигнал иона с  $m/z$  151,0400 указывает на отщепления ароматической части, сходной по структуре с ванилином). Максимальную интенсивность сигнала в масс-спектре имеет ион с  $m/z$  271,0976, который образуется путём отщепления воды и формальдегида от исходной молекулы. Согласно масс-спектру, предположительные пути фрагментации данного димера представлены на рисунке 21.



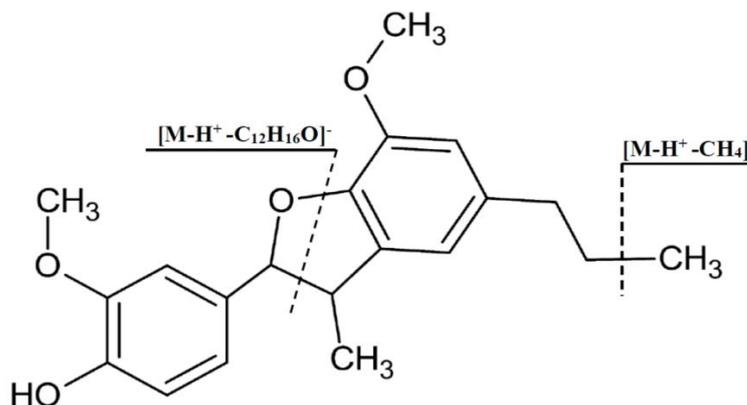
**Рисунок 21.** Предполагаемые пути фрагментации ГЭГГ в режиме ФИАД (-) в оптимизированных условиях

Фрагментация на отдельные ароматические звенья практически не характерна для секоизоларицирезинола (табл.11), что указывает на устойчивость углерод-углеродной связи G(8-8)G в условиях фотохимической ионизации (рис. 22).



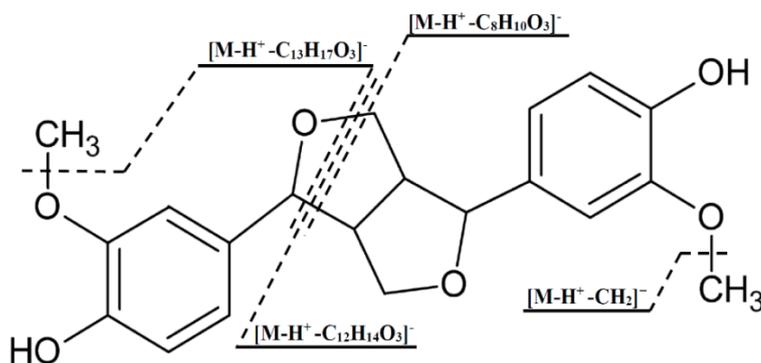
**Рисунок 22.** Предполагаемые пути фрагментации СИЛР в режиме ФИАД (-) в оптимизированных условиях

В масс-спектрах фенилкумарана (табл.11) наблюдается небольшая доля ионов с  $m/z$  151,0400, что может нам говорить о протекающих реакциях разрыва  $\alpha$ -O-4-связи с дальнейшим образованием структуры ванилина (рис. 23).



**Рисунок 23.** Предполагаемые пути фрагментации ДДДЭ в режиме ФИАД (-) в оптимизированных условиях

Спектры фрагментации пинорезинола указывают на образование большой доли деметилированных продуктов, а также на разрыв углерод-углеродной связи (рис. 24).



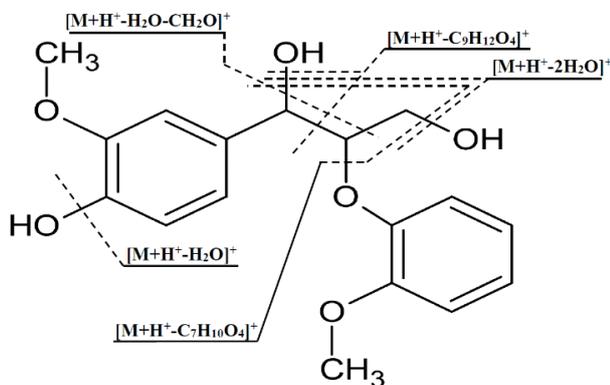
**Рисунок 24.** Предполагаемые пути фрагментации пинорезинола в режиме ФИАД (-) в оптимизированных условиях

Анализ масс-спектров димерных соединений в режиме ФИАД (+) также подтверждает неустойчивость простой эфирной связи в структуре ГЭГГ (табл. 12). Особенностью является то, что на спектре отсутствует протонированная молекула исходного модельного соединения, а основная интенсивность приходится на пик иона с  $m/z$  285,1116, образование которого, по-видимому, происходит в результате отщепления двух молекул воды от молекулы ГЭГГ. Предполагаемые пути фрагментации изображены на рисунке 25.

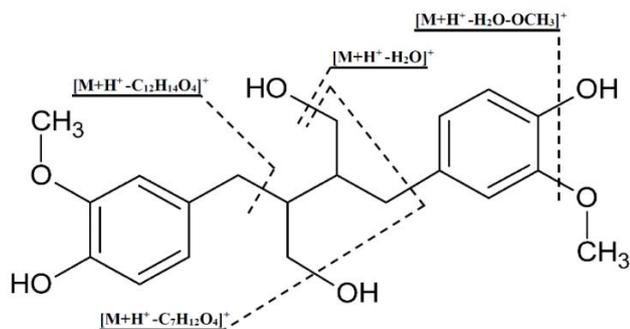
**Таблица 12.** Масс-спектры модельных димерных соединений, полученных с различными допантами в режиме генерации положительно заряженных ионов

Модельное соединение	Ион	$m/z$	$I_{\text{отн}}, \%$		
			Ацетон	Диоксан	ТГФ
ГЭГГ	$[M+H]^+$	321,1333	0	0	0
	$[M+H-H_2O]^+$	303,1221	15	19	4
	$[M+H-2H_2O]^+$	285,1116	100	100	100
	$[M+H-CH_2O-H_2O]^+$	273,1120	94	95	10
	$[M+H-C_7H_{10}O_4]^+$	163,0750	20	25	52
СИЛР	$[M+H]^+$	363,1802	0	0	0
	$[M+H-H_2O]^+$	345,1691	17	27	15
	$[M+H-2H_2O]^+$	327,1586	48	68	23
	$[M+H-2H_2O-CH_2OH]^+$	295,1324	35	27	5
	$[M+H-C_7H_{11}O_4]^+$	203,1070	46	40	51
	$[M+H-C_{12}H_{16}O_4]^+$	137,0601	100	100	100
ДДЭ	$[M+H]^+$	329,1742	100	100	100
	$[M+H-C_7H_8O_2]^+$	205,1224	5	11	7
ПР	$[M+H]^+$	359,1489	5	5	5
	$[M+H-H_2O]^+$	341,1378	100	100	100
	$[M+H-2H_2O]^+$	329,1274	18	17	20
	$[M+H-CH_2O-H_2O]^+$	311,1274	21	22	43
	$[M+H-C_8H_{11}O_3]^+$	203,0707	4	8	18
	$[M+H-C_{12}H_{16}O_4]^+$	137,0601	0	30	17

Диаметрально противоположная картина по сравнению с ФИАД (–) наблюдается для секоизоларициризенола (рис. 26). Происходит разрушение углерод-углеродной связи на два фенольных остатка с образованием 2-метокси-3-гидроксиметилбензола с  $m/z$  137.0601.

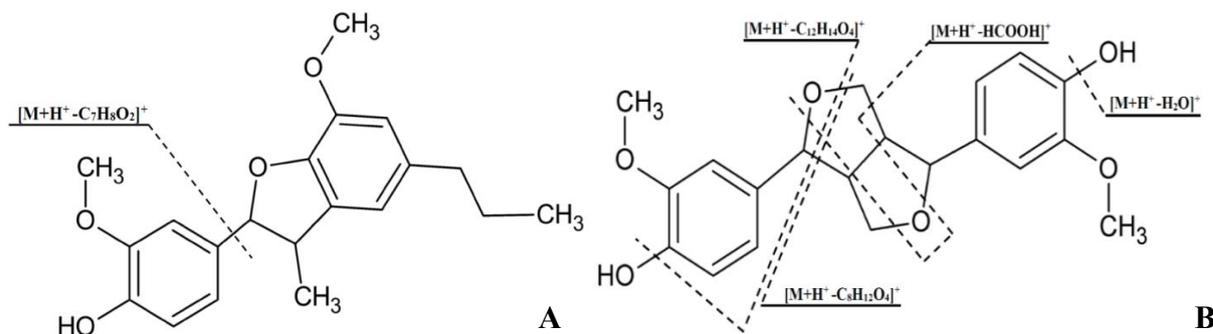


**Рисунок 25.** Предполагаемые пути фрагментации ГЭГГ в режиме ФИАД (+) в оптимизированных условиях



**Рисунок 26.** Предполагаемые пути фрагментации СИЛР в режиме ФИАД (+) в оптимизированных условиях

Существенно меньшей деструкции подвергается G(8-8)G связь в структуре фенилкумарана (рис. 27А) в режиме ФИАД (+). На спектре наблюдается интенсивный протонированный ион исходного димера. Также наблюдается отдельный пик с интенсивностью около 5-10%, образующийся предположительно в результате разрушения С-С связи между ароматическими структурами. Основные пути фрагментации пинорезинола – отщепление воды, с образованием иона-продукта с наибольшей интенсивностью сигнала, а также распад на ароматические составляющие (рис. 27В).



**Рисунок 27.** Предполагаемые пути фрагментации ДДЭ (А) и пинорезинола (В) в режиме ФИАД (+) в оптимизированных условиях

Сравнение путей фрагментации модельных соединений в режиме ФИАД с литературными данными о протекании таких процессов в ЭРИ-МСВР и ХИАД-МСВР [130] позволяет сделать вывод о том, что ЭРИ является более мягким методом ионизации и что пути фрагментации молекул заметно отличаются по сравнению с ФИАД-МСВР и ХИАД-МСВР. Сравнение же последних двух методов ионизации отражают сходные механизмы фрагментации и аналогичную долю осколочных ионов в спектрах. Эффект более жестких условий в режиме ФИАД

особенно хорошо демонстрируется в случае ГЭГГ, где спектры имеют основные пики  $[M-H-H_2O-CH_2O]^-$ , а не депротонированные молекулы, как в условиях ЭРИ [130]. В то же время следует отметить, что ЭРИ практически не позволяет добиться эффективной ионизации структур лигнина, не содержащих ионогенные группы.

Анализ интенсивностей основных пиков в спектрах модельных соединений в режимах ФИАД (+) и ФИАД (-) (табл. 13) указывает, что интенсивности сигналов с применением диоксана в качестве допанта в среднем в 2-6 раза выше по сравнению с ацетоном и, для некоторых аналитов, в 2-3 раза выше по сравнению с допированием ФИАД тетрагидрофураном. Учитывая тот факт, что уровень фонового сигнала 1,4-диоксана существенно ниже чем у остальных допантов, а при его применении наблюдается меньшая фрагментация модельных соединений, его использование в анализе лигнинов в режиме ФИАД является предпочтительным.

**Таблица 13.** Сравнение интенсивностей сигналов модельных соединений лигнина с применением различных допантов

Модельное соединение	Ион ( $I = 100\%$ )	Интенсивность ( $\times 10^7$ )		
		Ацетон	Диоксан	ТГФ
<b>ФИАД (-)</b>				
Изоэвгенол	$[M-H]^-$	6,7	7,7	3,7
Кониферилловый альдегид	$[M-H]^-$	290,0	780,0	300,2
Сиреневый альдегид	$[M-H]^-$	119,0	286,1	250,3
Феруловая кислота	$[M-H]^-$	80,5	462,1	237,2
Ацетованилон	$[M-H]^-$	71,4	389,1	198,1
Ванилин	$[M-H]^-$	182,4	263,2	243,5
ГЭГГ	$[M-H-H_2O-CH_2O]^-$	41,2	147,2	159,1
СИЛР	$[M-H]^-$	18,0	39,2	82,0
ДДДЭ	$[M-H]^-$	26,0	169,1	52,8
<b>ФИАД (+)</b>				
Изоэвгенол	$[M+H]^+$	1,7	9,0	2,4
Кониферилловый альдегид	$[M+H]^+$	3,6	22,2	4,1
Сиреневый альдегид	$[M+H]^+$	0,7	4,5	0,3
Феруловая кислота	$[M+H]^+$	2,4	19,5	1,3
Ацетованилон	$[M+H]^+$	0,6	3,6	0,3
Ванилин	$[M+H-2H_2O]^+$	4,6	7,2	5,5
ГЭГГ	$[M+H-C_{12}H_{16}O_4]^+$	4,4	5,2	1,1
СИЛР	$[M+H]^+$	30,2	26,1	19,8
ДДДЭ	$[M+H-H_2O]^+$	3,2	7,4	6,7

### Заклучение к главе 3

Масс-спектрометрия высокого разрешения на основе орбитальной ионной ловушки с фотохимической ионизацией при атмосферном давлении является мощным инструментом исследования природного лигнина на молекулярном уровне и позволяет детектировать несколько тысяч лигнинных олигомеров в диапазоне молекулярных масс от 300 до 2000 Да. Ацетон, 1,4-диоксан и тетрагидрофуран с добавкой 10% воды являются хорошими растворителями лигнина и способны выступать в качестве эффективных допантов, обеспечивающих генерирование как отрицательно, так и положительно заряженных ионов лигнинных веществ. Наибольшая эффективность фотохимической ионизации лигнина достигается при температуре ионного источника 500–550 °С и скорости потока 0,2–0,25 мл/мин. Наиболее предпочтительным допантом является 1,4-диоксан, обладающий минимальным фоновым сигналом и обеспечивающий получение наиболее интенсивных сигналов лигнинных олигомеров.

Разрешающая способность масс-анализатора Orbitrap на уровне 70 000 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 (при  $m/z$  200).

Высокая реакционная способность лигнина приводит к его частичной деградации в ионном источнике в условиях ФИАД, основными путями которой являются реакции деметилирования, а также отщепления воды, метанола или формальдегида от структурных фрагментов, содержащих алифатические гидроксильные группы. Среди связей между фенилпропановыми структурными единицами наименьшей устойчивостью в ФИАД характеризуются простые эфирные, в то время как углерод-углеродные связи слабо подвержены деструкции. В целом, не наблюдается глубокой фрагментации лигнинных олигомеров, что позволяет получать масс-спектры, адекватно отражающие молекулярный состав препаратов природного лигнина.

## ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ЭКСПРЕССНОЙ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ СОСТАВА МОНОМЕРНЫХ ФРАГМЕНТОВ МАКРОМОЛЕКУЛ ЛИГНИНА МЕТОДОМ ДИССОЦИАЦИИ, АКТИВИРОВАННОЙ СОУДАРЕНИЯМИ

### 4.1 Изучение активированной соударениями диссоциации модельных соединений лигнина

В основе структурных исследований лигнина и решения задач секвенирования лигнинных олигомеров лежат подходы, использующие технику тандемной масс-спектрометрии с активированной соударениями диссоциацией (ДАС) аналитов. Развитие соответствующей методологии требует понимания путей фрагментации лигнина в процессе ДАС, которое может быть достигнуто при проведении исследований на модельных соединениях, содержащих в своём составе наиболее распространённые в биополимере функциональные группы и межструктурные связи.

Как отмечалось выше, простая эфирная связь является одной из самых распространённых в лигнинах и характеризуется наименьшей энергией, что делает ее расщепление основной реакцией в процессах деполимеризации биополимера. Для моделирования этого процесса нами выбран типичный представитель димерных структур с  $\beta$ -O-4 связью - гваяциловый эфир гваяцилглицерина (ГЭГГ). Варьирование энергии соударения в широких пределах (10-90 эВ) позволило получить различные наборы продуктов фрагментации ГЭГГ, которые представлены в табл. 14. Тандемный масс-спектр модельного соединения даже при минимальной энергии соударения, равной 10 эВ, содержит в своем составе ионы-продукты, образующиеся при разрушении  $\beta$ -O-4 связи: фрагменты с  $m/z$  123,0452 и 195,0662, соответствующие структурам гваякола и 3-гидрокси-1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1-пропанона. Наибольшая интенсивность приходится на пик иона с  $m/z$  271,0974, отнесенного нами к 1-(4-гидрокси-3-метоксинбензол)-2-(оксигваякол)-этену, образующемуся за счет отщепления  $H_2O$  и  $CH_2O$  от исходной молекулы. Также в спектре наблюдаются структуры ацетованилона ( $m/z$  165,0556). Увеличение энергии соударения приводит к образованию в спектре ион-радикалов, а также ряда новых ионов-продуктов, среди которых выделяется

ион с  $m/z$  149,0243, который, видимо, относится к структуре 4-гидроксифенилглиоксаля.

Использование больших величин энергии соударения, равных 60–90 эВ, приводит к образованию значительного количества мономерных фенольных соединений с минимальными молекулярными массами ( $m/z$  121,0295; 109,0294; 93,0343), которые принадлежат структурам 4-гидроксибензальдегида, пирокатехина и фенола соответственно, что указывает на более активное протекание процессов деметилирования и деметоксилирования при повышении энергии соударения.

Анализ тандемных масс-спектров пинорезинола (табл.15) при энергии соударения 10–30 эВ показал преобладание в масс-спектрах интенсивного пика иона с  $m/z$  151,0400, что соответствует структуре ванилина и подтверждает процесс разрушения межструктурных углерод-углеродных связей в димере. На более высоких энергиях (свыше 30 эВ) в области малых масс мы также наблюдаем структуры гваякола, пирокатехина и фенола.

Интенсивный сигналы депротонированной молекулы ДДДЭ (табл.16) при низких энергиях соударения (10–30 эВ) в спектрах ДАС говорит об устойчивой углерод-углеродной связи в данной структуре. При энергии 10 эВ в тандемном масс-спектре обнаруживаются сигналы диметилированного ион-радикала с  $m/z$  312,1368, а также минорные сигналы ионов с  $m/z$  149,0607 и  $m/z$  109,0294, соответствующие 2-метокси-4-винилфенолу и пирокатехину, интенсивность которых увеличивается с ростом энергии соударения. При энергии свыше 30 эВ в масс-спектре наблюдаются сигналы депротонированной молекулы фенола с  $m/z$  93,0343.

Таким образом, для оценки структуры ароматических звеньев макромолекул лигнина применение высоких энергий соударения (> 30 эВ) нежелательно из-за активного протекания реакций деметилирования и деметоксилирования. Как показали эксперименты на модельных соединениях, даже минимальные энергии соударения (порядка 10 эВ) позволяют разрушить межструктурные связи (в частности, самую распространённую  $\beta$ -O-4 связь) с высвобождением и сохранением первоначальной структуры исходных мономеров без их последующих трансформаций.

Таблица 14. Продукты диссоциации ГЭГГ на разных величинах энергиях соударения

<i>m/z</i>	Ион	[M-H] <sup>-</sup>	Относительная интенсивность, %								
			10 эВ	20 эВ	30 эВ	40 эВ	50 эВ	60 эВ	70 эВ	80 эВ	90 эВ
319,1191	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0
271,0976	[M-H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	100	100	78	11	0	0	0	0	0
256,0742	[M-H-H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	4	14	100	89	15	2	0	0	0
195,0662	[M-C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	10	7	3	0	0	0	0	0	0
165,0556	[M-C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	14	21	44	27	6	2	0	0	0
164,0479	[M-C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> -H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	2	4	32	36	10	3	1	0	0
150,0322	[M-C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1	2	17	38	25	19	13	8	0
149,0242	[M-C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	1	1	22	100	100	100	100	100	100
123,0452	[M-C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	1	1	1	1	1	1	2	3	4
121,0295	[M-C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0	0	1	4	5	11	23	46	82
109,0294	[M-C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0	2	3	4	6	10	18
93,0343	[M-C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	0	0	0	0	0	4	10	23	47

**Таблица 15.** Продукты диссоциации пинорезинола на разных величинах энергиях соударения

			Относительная интенсивность, %								
<i>m/z</i>	Ион	[M-H] <sup>-</sup>	10 эВ	20 эВ	30 эВ	40 эВ	50 эВ	60 эВ	70 эВ	80 эВ	90 эВ
357,1343	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>6</sub>	100	29	1	1	0	0	0	0	0
342,1114	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	0	6	5	4	4	0	0	0	0
151,0400	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	69	100	100	85	75	48	30	27	10
136,0168	[M-H-C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	4	12	37	100	100	100	100	100	100
121,0295	[M-C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0	0	10	14	22	31	39
109,0294	[M-C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0	0	0	0	3	12	17	28	30
93,0343	[M-C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	0	0	0	0	6	18	20	37	45

**Таблица 16.** Продукты диссоциации дигидродегидродиизоэвгенола на разных величинах энергиях соударения

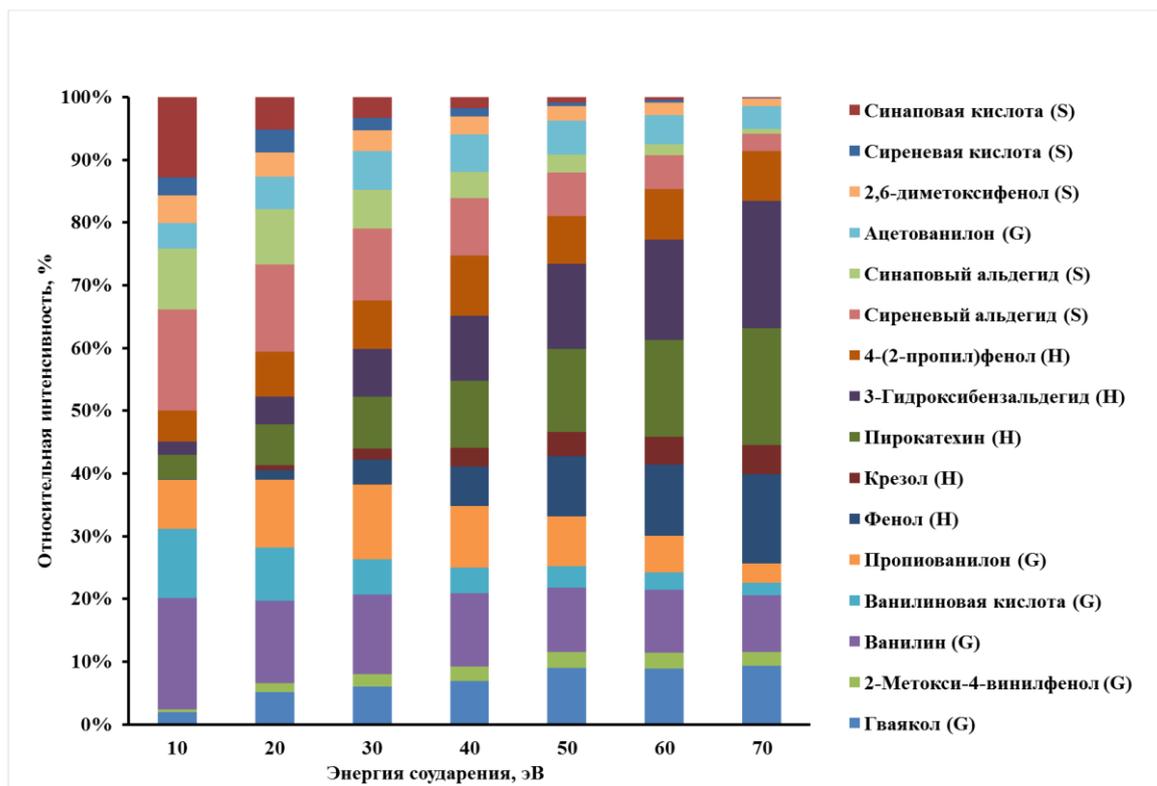
			Относительная интенсивность, %								
<i>m/z</i>	Ион	[M-H] <sup>-</sup>	10 эВ	20 эВ	30 эВ	40 эВ	50 эВ	60 эВ	70 эВ	80 эВ	90 эВ
327,1600	[M-H] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub>	100	100	23	10	0	0	0	0	0
312,1368	[M-H-CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	19	63	100	22	4	0	0	0	0
297,1132	[M-H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>4</sub>	0	6	65	85	100	48	30	27	10
149,0615	[M-H-C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	5	13	31	25	11	5	0	0	0
134,0368	[M-C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	0	0	15	42	66	84	50	19	10
109,0294	[M-C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	0	0	4	0	3	12	17	28	45
93,0343	[M-C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	0	0	0	5	12	18	28	41	55

Учитывая высокую сложность строения лигнина и разнообразие входящих в его состав олигомеров, анализ биополимера на основе tandemных масс-спектров отдельных ионов-предшественников не может дать адекватную картину химического состава и структуры препарата в целом. Преодоление данной проблемы возможно за счет исключительно трудоемкой реализации ДАС максимального числа отдельных олигомеров или, альтернативно, расширения диапазона  $m/z$  ионов-предшественников, одновременно подвергаемых ДАС (т.н. широкополосная ДАС). Последняя техника легко реализуется с использованием масс-спектрометров на основе орбитальной ионной ловушки, уникальные технические особенности которых (наличие линейной ионной ловушки HCD для реализации ДАС при повышенной энергии и изогнутой квадрупольной ловушки S-Trap для накопления ионов-предшественников и ионов-продуктов в широком диапазоне масс) позволяют осуществлять широкополосную ДАС практически неограниченного набора лигнинных олигомеров (с шириной окна до 1200 Да).

#### **4.2 Определение относительного содержания сирингильных, гваяцильных и *n*-гидроксифенильных структурных единиц лигнина методом tandemной масс-спектрометрии с использованием широкополосной ДАС**

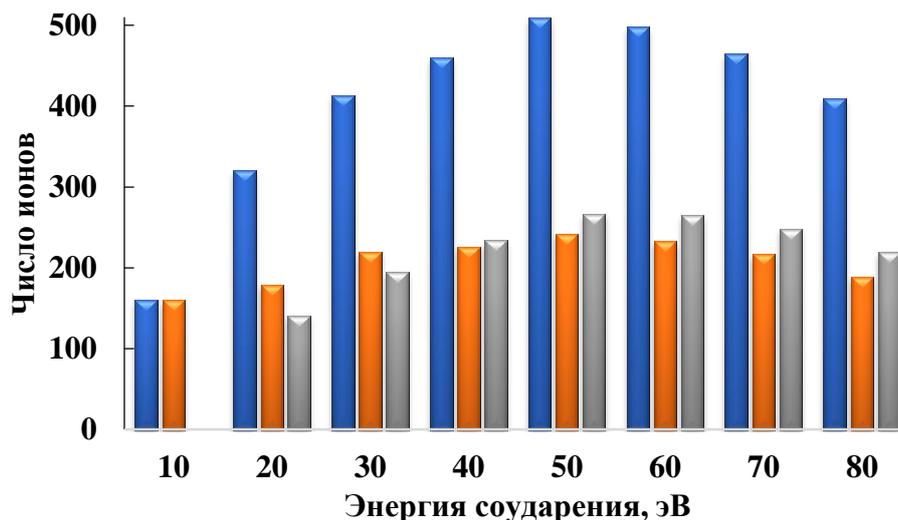
Наиболее важным с практической точки зрения применением широкополосной ДАС для анализа лигнинов является определение относительного содержания сирингильных, гваяцильных и *n*-гидроксифенильных структурных единиц (рис. 1) или т.н. S/G/H соотношений, играющих исключительно важную роль в классификации природных лигнинов и прогнозировании их физико-химических свойств. Для решения такой задачи нами предложено использование диапазона ионов-предшественников с  $m/z$  300–1000, охватывающего наиболее интенсивные пики в масс-спектре, принадлежащие структурам димеров-гексамеров лигнина. Широкополосная ДАС позволила получить набор мономерных ( $m/z$  90–250) ионов-продуктов, относящихся к S, G и H структурным типам. При этом соотношение интенсивностей соответствующих сигналов в масс-спектрах ожидаемо зависит от используемой величины нормализованной энергии соударений (рис. 28) вследствие протекания, отмеченных в разделе 4.1. (на примере

модельных соединений), процессов деметилирования и деметоксилирования ароматических звеньев макромолекулы.



**Рисунок 28.** Изменения относительных интенсивностей продукт-ионов в тандемных масс-спектрах диоксанлигнина березы от величины энергии соударения

С увеличением энергии наряду со снижением доли сирингильных и ростом доли *n*-гидроксифенильных структур наблюдается и возрастание суммарной интенсивности пиков в масс-спектре (полного ионного тока), а также числа образующихся в ходе ДАС ионов-продуктов (рис. 29). Максимум наблюдается при энергии 40 эВ, при этом ее дальнейшее повышение приводит к противоположному эффекту за счет глубокой деградации лигнинных олигомеров. Примечательно, что при энергиях соударений  $\geq 20$  эВ в тандемных масс-спектрах появляется значительное количество сигналов ион-радикалов, доля которых непрерывно растет с увеличением энергии соударений и достигает значений более 50% от всех образующихся ионов-продуктов.



**Рисунок 29.** Изменение числа ионов в тандемном масс-спектре в диапазоне  $m/z$  90-250 при различных величинах энергии соударения.

Цвет столбцов на диаграмме соответствует типу образующихся фрагментов: синий – общее число мономерных фрагментов, оранжевый – фрагментные ионы, серый – фрагментные ион-радикалы

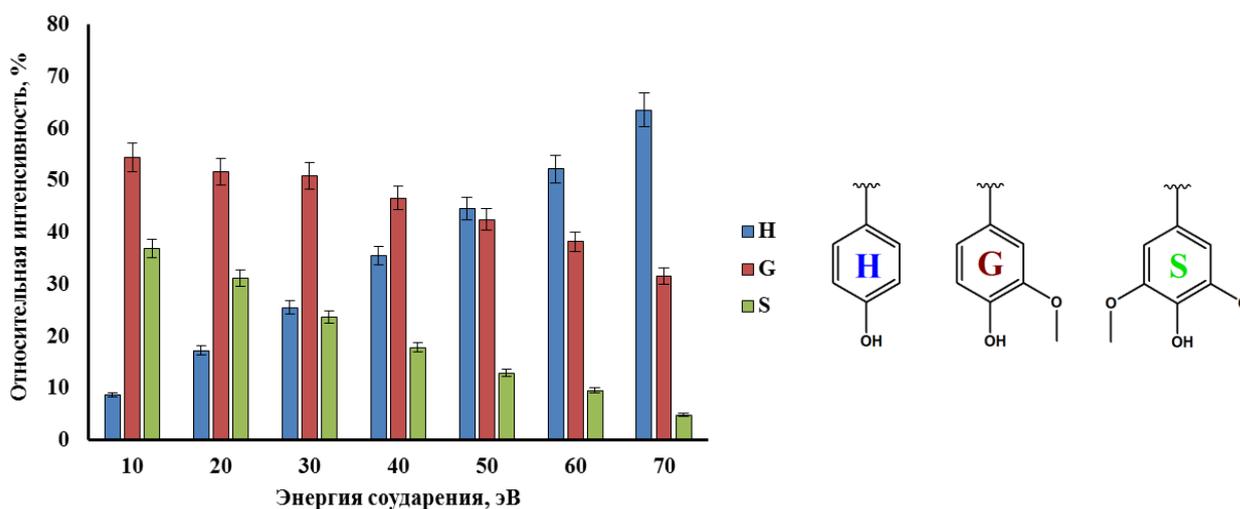
В получаемом с применением техники ФИАД-МС/МСВР наборе мономерных продуктов по аналогии с методами нитробензольного окисления лигнина и пиролитической газовой хроматографии/масс-спектрометрии можно выделить ряд соединений, которые могут быть использованы в качестве целевых маркеров для количественного определения содержания *n*-гидроксифенильных (Н), гваяцильных (G) и сиригильных (S) структурных единиц макромолекул лигнина, представленных в таблице 17. В качестве критериев выбора таких соединений использовались соответствие типичным S, G и H-структурным фрагментам лигнина, а также высокие относительные интенсивности (>5%) сигналов соответствующих ионов.

При минимальной энергии соударения (10 эВ) тандемный масс-спектр диоксанлигнина березы характеризуется преимущественно ионами, соответствующим G- и S-структурным фрагментам лигнина (рис. 30), что согласуется с литературными данными [197]. Повышение энергии соударения от 10 до 70 эВ ведет к практически пропорциональному росту вклада ионов H-структур (от 9 % до 65 %), при этом доля ионов G-структур снижается незначительно (от 55% до 35%), в то время как вклад ионов S-структур снизился в 7 раз (от 38% до 5 %).

**Таблица 17.** Типичные представители мономерных фенолов с различной структурой ароматических ядер в тандемном масс-спектре лигнина

№	Структура	Ион [М-Н] <sup>-</sup>	m/z	Тип структуры
1	Фенол	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O] <sup>-</sup>	93,0335	H
2	о-Крезол	[C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O] <sup>-</sup>	107,0491	H
3	Пирокатехин	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	109,0284	H
4	4-Гидроксибензальдегид	[C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	121,0284	H
5	2,5-Ксиленол	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O] <sup>-</sup>	121,0648	H
6	Гваякол	[C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	123,0441	G
7	4-(2-пропил)фенол	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O] <sup>-</sup>	133,0648	H
8	Крезол	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	137,0597	G
9	2-Метокси-4-винилфенол	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	149,0597	G
10	Ванилин	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	151,0389	G
11	2,6-диметоксифенол	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	153,0546	S
12	Изоэвгенол	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	163,0754	G
13	Ацетованилон	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	165,0546	G
14	Дигидроэвгенол	[C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	165,0910	G
15	Ванилиновая кислота	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	167,0338	G
16	Гваяцилацетон	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	179,0703	G
17	Сиреневый альдегид	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	181,0495	S
18	2,6-диметокси-4-(2-пропил)фенол	[C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	193,0859	S
19	3-Гидрокси-1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1-пропанон	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	195,0652	G
20	Синаповый альдегид	[C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	207,0652	S
21	Сирингилацетон	[C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	209,0808	S

Такие изменения состава масс-спектров связаны в первую очередь с усилением процессов фрагментации высокомолекулярной фракции лигнина, а также с протеканием процессов частичного деметоксилирования. Повышение энергии ведет также к образованию в области более низких масс (<100 Да) остатков трех кислот – глиоксальной (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>), которые образуются в результате отщепления боковых цепей фенилпропановых структур. Для минимизации процессов деметилирования и деметоксилирования в качестве оптимальной энергии соударения предложено значение, равное 10 эВ, которое обеспечивает генерацию достаточно интенсивных сигналов мономеров при их минимальной деградации в ходе ДАС. Выбор в качестве оптимальной энергии в 10 эВ также объясняется близостью получаемых результатов S/G/H-соотношений при сравнении их с литературными данными, а также при сравнении с альтернативными методами определения мономерного состава лигнина.



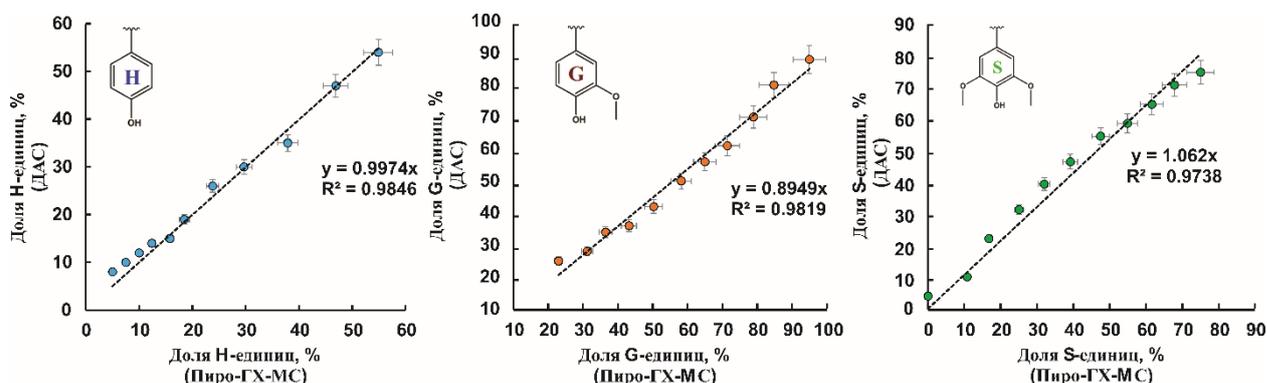
**Рисунок 30.** Влияние энергии соударений на интенсивность пиков мономерных структур H, G и S-типов в tandem масс-спектрах лигнина березы, полученных методом широкополосной ДАС ( $m/z$  300–1000,  $n=3$ ,  $P=0.95$ )

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. 18), полученные двумя методами содержания структур H, G и S-типов имеют близкие значения, однако, в ряде случаев наблюдаются существенные различия, которые могут быть обусловлены несовершенством химического деградиационного метода.

**Таблица 18.** 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 33 модельных смесей препаратов лигнинов<sup>2</sup> лиственных, хвойных и травянистых растений, полученных с использованием ФИАД-МС/МСВР и методом Пиро-ГХ-МС демонстрирует линейные корреляционные зависимости ( $R^2 > 0,97$ ) с угловым коэффициентом, близким к 1 (рис. 31).



**Рисунок 31.** Корреляционные зависимости результатов определения гваяцильных, синригильных и *p*-гидроксифенильных структурных единиц лигнина методами Пиро-ГХ-МС и ФИАД-МС/МСВР ( $n=3$ ,  $P=0,95$ )

Важнейшим показателем пригодности метода ДАС для оценки содержания основных структур в лигнине является воспроизводимость. Для проверки воспроизводимости получаемых результатов были записаны МС/МС спектры 12 диоксанлигнинов в 6 параллельных экспериментах, рассчитаны доли Н-, G-, S-структур в каждом препарате и определены соотношения S/G (табл. 19).

**Таблица 19.** S/G/H соотношения для различных лигнинов, полученные методами Пиро-ГХ/МС и тандемной масс-спектрометрии ( $n=6$ ,  $P=0,95$ )

Исходное сырье	Пиро-ГХ/МС S/G	ФИАД-МС/МСВР			S/G
		Структурные единицы			
		H, %	G, %	S, %	
<b>Лигнины лиственных пород древесины</b>					
Береза	1,54±0,05	6	39	55	1,41±0,07
Черемуха	1,04±0,12	6	41	53	1,29±0,06
Ива	1,19±0,08	3	47	50	1,06±0,03
Яблоня	1,24±0,10	2	44	54	1,22±0,08
Сирень	1,20±0,06	3	48	49	1,02±0,02

<sup>2</sup> 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

<b>Лигнины травянистых растений</b>					
Крапива	0,35±0,03	7	62	31	0,47±0,03
Кипрей	0,38±0,05	11	59	30	0,51±0,04
Осока	0,22±0,04	11	63	24	0,37±0,02
Тритикале	0,29±0,03	8	64	27	0,40±0,02
Кукуруза	0,31±0,04	2	66	32	0,45±0,03
<b>Лигнины мхов</b>					
Кукушкин лён	0,20±0,04	60	30	10	0,33±0,02
Сфагнум	0,12±0,04	54	42	4	0,10±0,01

Наблюдаемые результаты определения соотношений S/G двумя методами показали близкие значения, что 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).

#### **Заключение к главе 4**

Определение и количественная оценка содержания синрингильных, гваяцильных и *n*-гидроксифенильных структурных единиц является одной из основных и первоочередных задач в характеристике лигнинов. В настоящее время данный анализ связан с предварительной химической или термической деструкцией полимера, что требует продолжительной и трудозатратной пробоподготовки, большого количества образца, работы с опасными реагентами. Предложенный нами способ определения S/G/H соотношений с применением техники диссоциации, активированной соударениями (10 эВ) в широком диапазоне масс олигомеров лигнина, может стать альтернативой имеющимся деградационным методам, сочетающим в себе такие преимущества как экспрессность (продолжительность аналитического цикла не превышает 5 мин), информативность и простота анализа. Несомненным достоинством также является то, что в ходе единичного анализа можно получить информацию как о полном молекулярном составе лигнина, так и о количественном составе структурных единиц лигнина. Разработанный способ демонстрирует сопоставимые результаты с широко применяемым в настоящее время методом пиролитической газовой хроматографии/масс-спектрометрии.

## ГЛАВА 5. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИГНИНОВ КАК СЛОЖНЫХ ОБЪЕКТОВ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ХЕМОМЕТРИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Масс-спектры лигнина отличаются исключительной сложностью вследствие нерегулярности полимера и наличия трёхмерной сетчатой структуры, образующейся в результате в значительной степени стохастических процессов образования биополимера в растительных тканях при окислительном сочетании монолигнолов. 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 хемометрический анализ «образов» химического состава, отражающих вклад всех детектируемых в препаратах лигнина соединений.

### 5.1 Визуализация элементных составов лигнинных олигомеров методом ван Кревелена

Диаграммы ван Кревелена (ДВК) представляют собой способ визуализации химического состава сложных объектов путем построения графика зависимости атомного соотношения Н:С от соотношения О:С (или других элементов) для каждого соединения в смеси. Использование высокого разрешения позволяет с высокой точностью определять элементные составы индивидуальных соединений в сложной смеси, что позволяет генерировать более информативные диаграммы ВК и давать некоторое представление о природе химических веществ в смеси.

Для визуализации элементных составов лигнинных олигомеров необходимо было установить ряд параметров для получения достоверных наборов ионов и их брутто-формул. К таким параметрам относятся диапазон масс олигомеров, величина разрешающей способности масс-анализатора при записи масс-спектров, условия и ограничения для определения элементных составов.

Логично, что для получения наиболее полной «картины» молекулярного состава того или иного лигнина, диапазон масс ионов, по элементным соотношениям которых в дальнейшем строится диаграмма ВК, должен быть наиболее широк. Однако, учитывая достигаемую точность определения величин  $m/z$  на уровне  $\sim 1$  ppm, надёжное установление брутто-формул аналитов возможно

для молекулярных масс до  $\sim 1$  кДа. Данная величина была взята в качестве верхнего предела диапазона масс. Нижняя граница может быть равной массе минимальной ароматической структурной единицы лигнина – фенола.

Принадлежность большинства лигнинов к СНО-классу значительно упрощает расчет элементных составов олигомеров. Если верхняя граница числа атомов Н, О и С в их структуре не закреплена и зависит лишь в некоторой степени от верхнего диапазона определяемых масс, то минимальные содержания атомов фиксированы:  $C = 6$ ;  $H = 5$ ;  $O = 1$ . Данные величины соответствуют депротонированной молекуле фенола – как минимальной структурной единице лигнина.

С ростом молекулярной массы число предлагаемых элементных составов для каждого иона в масс-спектре увеличивается, что создает неопределенность в выборе правильных брутто-формул и может исказить истинную картину молекулярного состава лигнина на диаграммах ван Кревелена. Экспериментально установлено, что в диапазоне масс до 700–740 Да для всех ионов в масс-спектре лигнина однозначно определяется единственный вариант брутто-формулы (при допустимом отклонении экспериментального значения  $m/z$  от расчетного на уровне 5 ppm) (табл. 20). Для ионов с массой свыше 740 Да определяется уже до четырех возможных элементных составов. Для однозначного приписывания элементных составов тому или иному высокомолекулярному иону нами предложено использовать следующие ограничения в алгоритме расчета брутто-формул: для диапазона  $m/z$  300-700 число элементов находится в границах  $6 < C < 100$ ,  $1 < O < 100$ ,  $5 < H < 100$ , а для диапазона  $m/z$  700–1000:  $40 < C < 100$ ,  $10 < O < 100$ ,  $5 < H < 100$ . Такие значения выбраны исходя из того, что в диапазоне молекулярных масс свыше 600 Да лигнин представлен фрагментами в виде олигомеров с 4-мя и более фенилпропановыми звеньями (установлено, что для лигнинов хвойной породы древесины одно фенилпропановое звено представляет собой следующий элементный состав -  $C_{10}H_{12}O_4$ , а для лиственной  $C_{11}H_{14}O_5$ ) [130]. Использование таких ограничений позволяет достичь однозначного определения элементных составов и исключить получение ложных значений (табл. 20), которые могут определяться при отсутствии учета химической структуры лигнина.

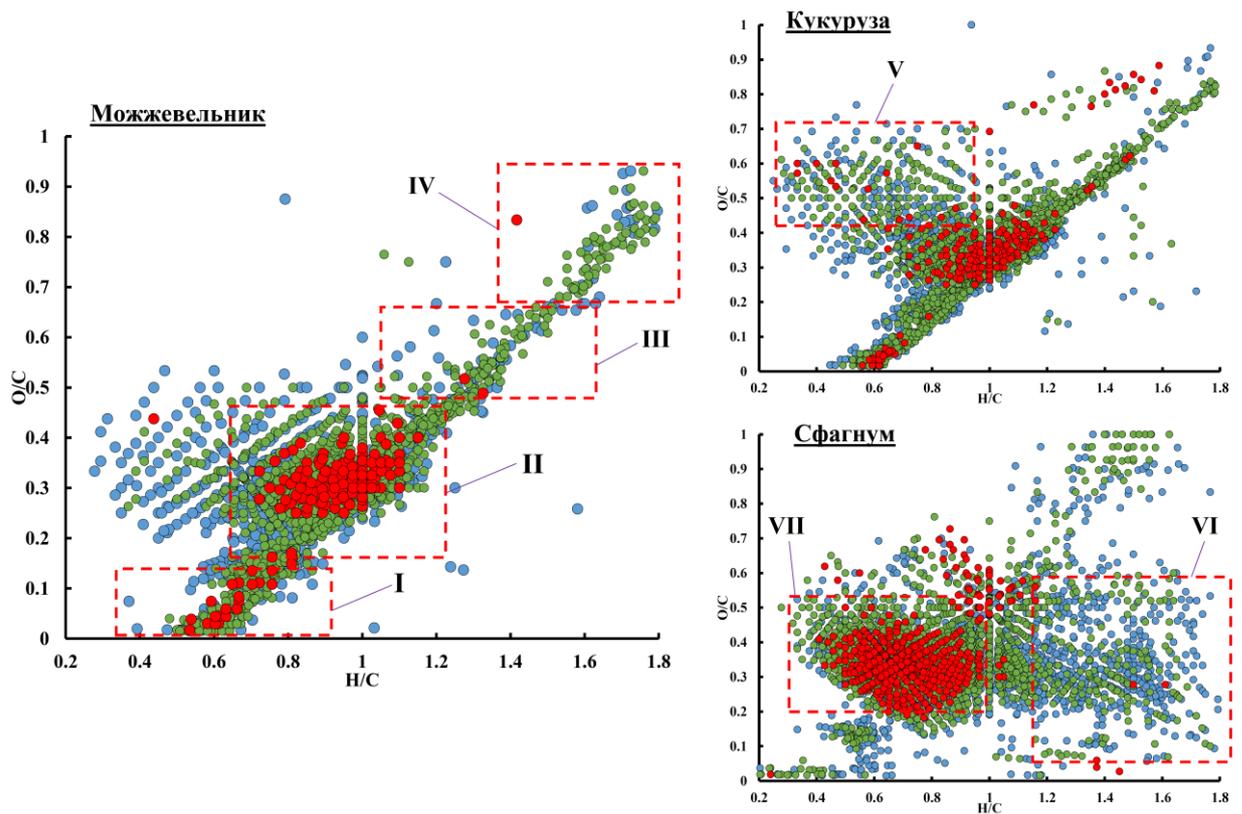
**Таблица 20.** Элементные составы различных ионов в масс-спектре диоксанлигнина ели

<i>m/z</i>	Ограничение элементных составов: 6<C<100, 1<O<100, 5<H<100		Ограничение элементных составов Для диапазона <i>m/z</i> 300-700: 6<C<100, 1<O<100, 5<H<100 Для диапазона <i>m/z</i> 700-1000: 40<C<100, 10<O<100, 5<H<100	
	формула [M-H] <sup>-</sup>	Δ, ppm	формула [M-H] <sup>-</sup>	Δ, ppm
355,1194	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	1,99	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>6</sub>	1,99
535,1985	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub>	2,13	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub>	2,13
697,2308	C <sub>39</sub> H <sub>37</sub> O <sub>12</sub>	2,51	C <sub>39</sub> H <sub>37</sub> O <sub>12</sub>	2,51
729,2570	C <sub>40</sub> H <sub>41</sub> O <sub>13</sub>	2,35	C <sub>40</sub> H <sub>41</sub> O <sub>13</sub>	2,35
745,2527	C <sub>58</sub> H <sub>33</sub> O	-1,34	C <sub>40</sub> H <sub>41</sub> O <sub>14</sub>	3,36
	C <sub>40</sub> H <sub>41</sub> O <sub>14</sub>	3,36		
	C <sub>33</sub> H <sub>45</sub> O <sub>19</sub>	-4,51		
877,3116	C <sub>67</sub> H <sub>41</sub> O <sub>2</sub>	0,42	C <sub>42</sub> H <sub>53</sub> O <sub>20</sub>	-2,26
	C <sub>42</sub> H <sub>53</sub> O <sub>20</sub>	-2,26		
	C <sub>49</sub> H <sub>49</sub> O <sub>15</sub>	4,43		
907,3234	C <sub>43</sub> H <sub>55</sub> O <sub>21</sub>	-0,82	C <sub>43</sub> H <sub>55</sub> O <sub>21</sub>	-0,82
	C <sub>68</sub> H <sub>43</sub> O <sub>3</sub>	1,78		
	C <sub>61</sub> H <sub>47</sub> O <sub>8</sub>	-4,68		
999,3327	C <sub>56</sub> H <sub>55</sub> O <sub>17</sub>	0,76	C <sub>56</sub> H <sub>55</sub> O <sub>17</sub>	0,76
	C <sub>74</sub> H <sub>47</sub> O <sub>4</sub>	-2,73		
	C <sub>38</sub> H <sub>63</sub> O <sub>30</sub>	4,29		

На ДВК для большинства препаратов лигнина можно выделить четыре основные области (рис. 27). 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<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>. 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 = 1,5–2,0 и O/C = 0,7–1,0), а область I характерная для сильно ненасыщенных структур с низким содержанием кислорода (H/C = 0,3–0,6, O/C = 0,0–0,1).

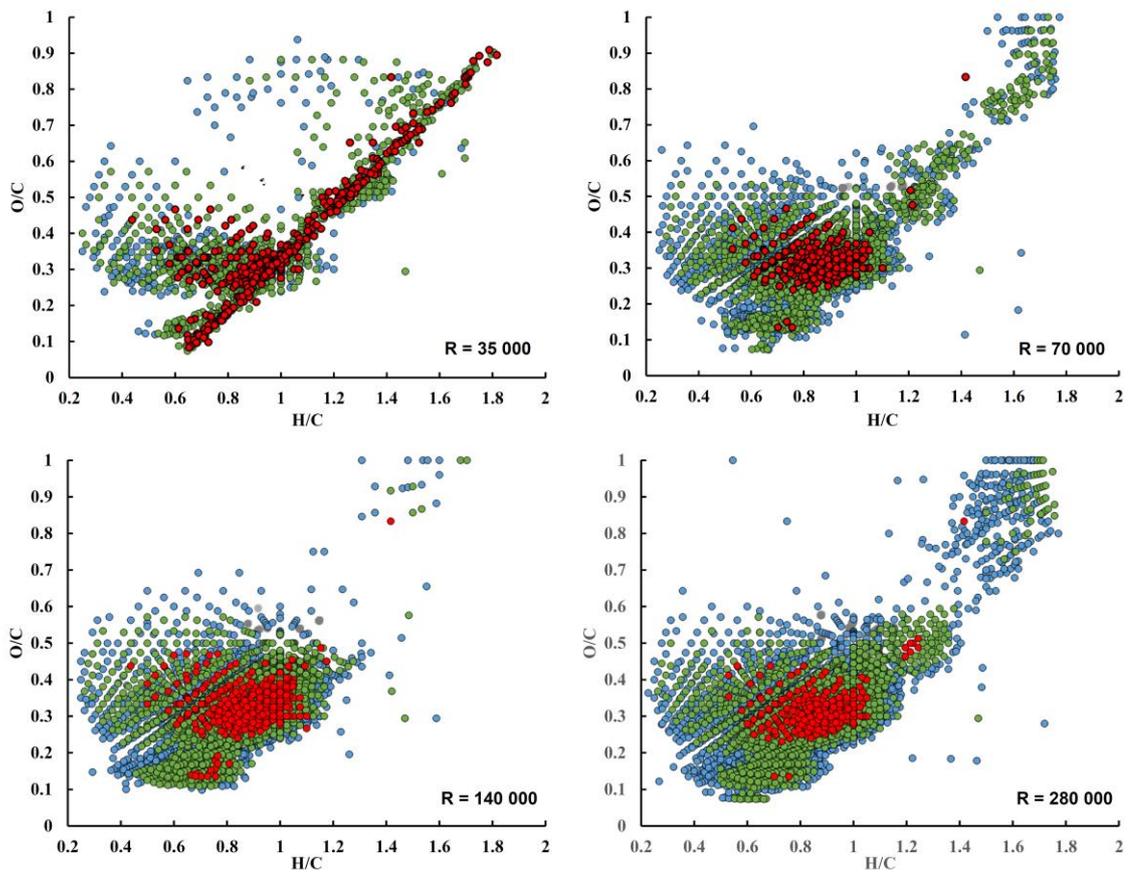
Одним из преимуществ ДВК является возможность визуального сравнения химических составов различных препаратов лигнина и отслеживание их

трансформации в различных процессах. Представленные на рисунке 32 ДВК диоксанлигнинов сфагнома, кукурузы и можжевельника существенно отличаются друг от друга, что свидетельствует о возможности экспрессной характеристики молекулярного состава исследуемых препаратов. Так, отличие лигнина кукурузы заключается в присутствии значительного количества олигомеров с повышенным содержанием кислорода (область V), которые располагаются в области элементарных соотношений  $O/C = 0,4-0,7$ ;  $H/C = 0,2-0,8$  и характерных 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.



**Рисунок 32.** Диаграммы ван Кревелена диоксанлигнина можжевельника, кукурузы и сфагнома. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пика в масс-спектре: 0,1–1% (синий), 1–10% (зеленый), 10–100% (красный)

Величина разрешающей способности масс-анализатора вносит значительный вклад в получение информативных диаграмм ВК, так как с ростом  $R$  резко увеличивается количество отдельных ионов на масс-спектрах, а следовательно, и компонентов на диаграмме. Сравнение полученных при разных спектральных разрешениях (в диапазоне  $m/z$  300–1000) «образов» исследуемого препарата лигнина (рис. 33) в целом подтверждает сделанный вывод о необходимости работы с  $R \geq 70\,000$  для характеристики компонентов сложного объекта, дающих максимально интенсивные пики в масс-спектрах. В то же время варьирование величины  $R$  в диапазоне 70 000 – 280 000 приводит к существенным изменениям картины для пиков средней и малой интенсивности, зависящей также от принадлежности соответствующих лигнинных олигомеров к определенным типам структур.



**Рисунок 33.** Диаграммы ван Кревелена диоксанлигнина древесины кедра, полученные на основе масс-спектров с различными величинами спектрального разрешения. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пика в масс-спектре: 0,1–1% (синий), 1–10% (зеленый), 10–100% (красный).

Большинство детектируемых фенилпропановых (гваяцилпропановых) структур с различной степенью полимеризации формирует центральную область диаграммы ( $O/C = 0,2-0,6$  и  $H/C = 0,3-1,2$ ), которая адекватно отображается на всех уровнях спектрального разрешения от 70 000 и выше (при  $m/z$  200). Иная картина характерна для области, содержащей структуры с низкой степенью ненасыщенности и высоким содержанием кислорода ( $O/C = 0,6-1,0$  и  $H/C = 1,2-2,0$ ) и относящейся преимущественно к лигноуглеводным комплексам. Отображаемые в ней соединения имеют сравнительно высокую молекулярную массу ( $> 800$  Да) наряду с небольшой интенсивностью сигналов в масс-спектрах. В связи с этим, их элементные составы не могут быть надежно определены при  $R = 70\ 000$ . Интересно, что повышение разрешающей способности масс-анализатора до 140 000 приводит к резкому снижению количества детектируемых элементных составов в данной области, в то время как дальнейшее удвоение величины  $R$  позволяет получить весьма подробную картину молекулярного состава лигноуглеводных комплексов. Аналогичная ситуация характерна для небольшой области в координатах  $O/C = 0,4-0,6$  и  $H/C = 1,2-1,4$ , которая проявляется при  $R = 280\ 000$  и формируется, вероятно, за счет гваяцилглицериновых структур, а также гликозилированных олигомеров с молекулярными массами  $> 800$  Да.

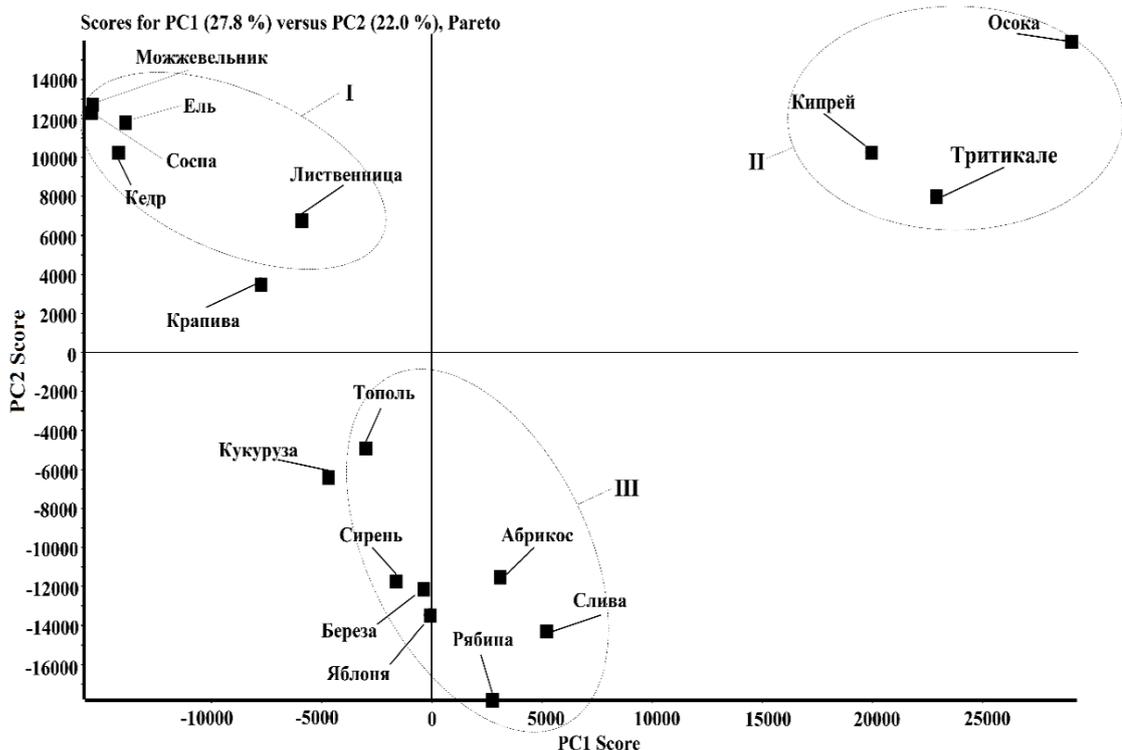
Таким образом диаграммы ван Кревелена являются одним из наиболее простых методов визуализации молекулярного состава сложных объектов. Анализ полученных диаграмм для широкого спектра природных лигнинов показал их схожесть внутри одного класса растений и в то же время позволил наглядно продемонстрировать различие между молекулярными составами лигнинов различного происхождения (древесина, травы, мхи).

## **5.2 Классификация лигнинов на основе масс-спектров высокого разрешения с использованием метода анализа главных компонент**

Представление молекулярного состава лигнинов на диаграммах ван Кревелена дает лишь возможность визуального сравнения, а для установления специфики тех или иных образцов обработку массивов данных необходимо проводить с применением математических методов выявления различий между масс-спектрами. Одним из таких способов является метод анализа главных

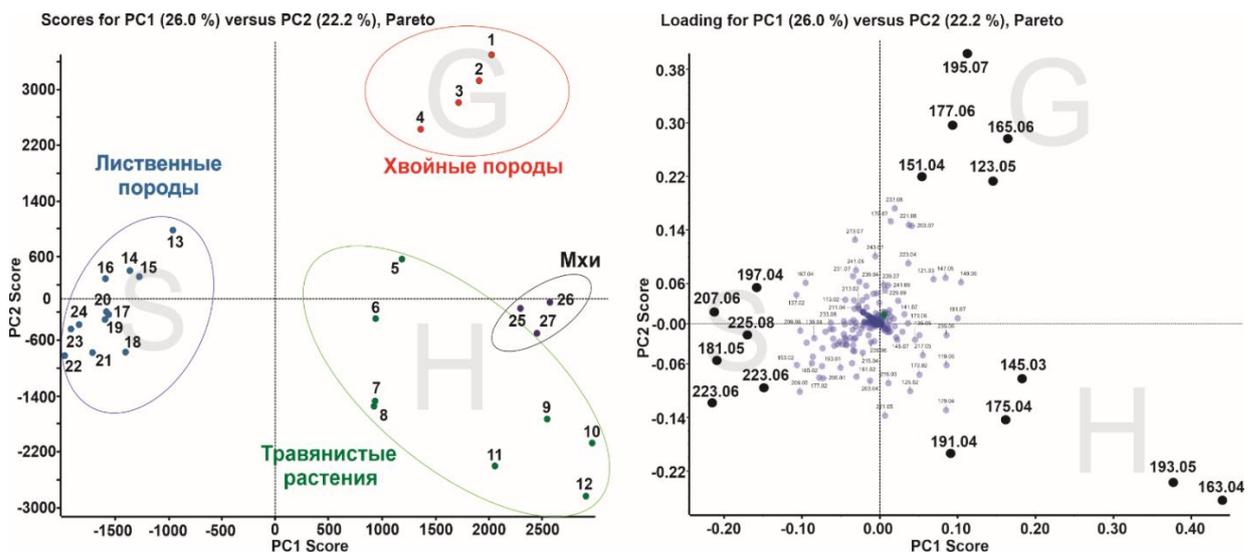
компонент (Principal component analysis, PCA). Данный метод позволяет выявлять специфические пики в масс-спектрах, характерные для конкретных типов лигнинов (хвойных, лиственных, низших растений и пр.).

На первом этапе была проведена обработка полученных масс-спектров лигнина (16 представителей лигнина древесного и травянистого происхождения) с применением метода главных компонент. В качестве исходных данных были выбраны масс-листы в диапазоне  $m/z$  300–1000 с пороговым значением относительной интенсивности пиков 1%. При применении PCA за оптимальное количество главных компонент брали то число, которое будет достаточным для объяснения 90% дисперсии данных. На всех этапах эксперимента это число оказалось равным 5. На графике счетов (рис. 34) можно наблюдать 4 области: область лиственных, хвойных, травянистых лигнинов, и некую среднюю область между представителями лигнинов хвойной и лиственной древесины, куда попали лигнины крапивы и кукурузы. Попадание данных лигнинов в эту область объясняется наличием в их спектрах интенсивных пиков ионов, элементный состав которых одинаков с составом ионов в лигнинах как хвойных пород, так и лиственных.



**Рисунок 34.** Оценка масс-спектров лигнина различного происхождения методом главных компонент (график счетов)

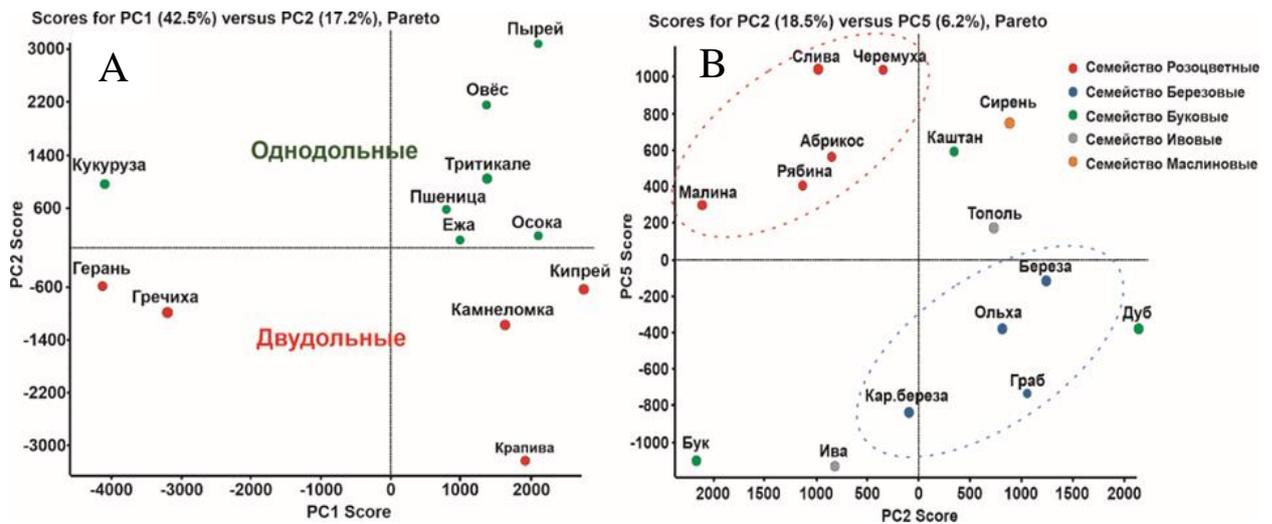
Так, например, ионы с  $m/z$  355,1197; 535,1993 и 729,2569 (вносящие значительный вклад в PC1) обнаруживаются как на масс-спектрах лигнина хвойной древесины, так и лигнина крапивы и кукурузы. Вне зависимости от используемых главных компонент не удалось достичь однозначной классификации лигнинов с использованием масс-листа в диапазоне  $m/z$  300–1000. Это связано с чрезвычайной сложностью масс-спектров и многообразием входящих в состав лигнина олигомеров, что приводит к наличию в масс-спектрах различных препаратов идентичных по элементным составам структур. В связи с этим, для надежной классификации лигнинов рационально использовать тандемные масс-спектры, полученные с использованием широкополосной ДАС. Наибольшее различие между лигнинами в этом случае наблюдается при исследовании их низкомолекулярной области тандемного масс-спектра, отражающей состав и соотношение различных структурных единиц в макромолекулах. Нами проанализированы полученные тандемные масс-спектры ионов-продуктов диапазоне  $m/z$  90–250. Визуализация полученных данных с применением метода главных компонент позволила выявить основные различия в сложных тандемных масс-спектрах диоксанлигнинов различных растений. Так на графике счетов (рис. 35) можно выделить 3 области, где сосредоточены представители лигнинов хвойных, лиственных, моховидных и травянистых растений.



**Рисунок 35.** Диаграмма счетов (Score) и нагрузок (Loading) для тандемных масс-спектров различных препаратов лигнина

График нагрузок (рис. 35) показывает, что ионы-продукты с  $m/z$  151,0400; 123,0451; 165,0558 и 195,0664 (вносят наибольший вклад в PC2) наиболее характерны для масс-спектров лигнинов хвойных пород древесины и относятся к эмпирическим формулам  $C_8H_8O_3$ ,  $C_7H_8O_2$ ,  $C_9H_{10}O_3$  и  $C_{10}H_{12}O_4$ , которые соответствуют ванилину, гваяколу, ацетованилону и 3-гидрокси-1-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-1-пропанону. Ионы-продукты с  $m/z$  181,0508; 209,0834 и 207,0663 (PC3) соответствуют масс-спектрам лигнинов лиственных пород и имеют формулы  $C_9H_{10}O_4$ ,  $C_{11}H_{11}O_4$  и  $C_9H_9O_4$ . Данные формулы принадлежат сиреневому альдегиду, синаповому альдегиду и сирингилацетону. Отличительной особенностью лигнинов травянистых растений является наличие в спектрах высокоинтенсивного иона-продукта с  $m/z$  163,0389, который соответствует *n*-кумаровой кислоте, а также ионов других представителей коричных кислот, присущих травянистым растениям (PC1).

Применение метода главных компонент для анализа МС/МС спектров лигнинов травянистых растений (рис. 36А) позволило провести более глубокую их классификацию по ботаническому происхождению (лигнины однодольных растений представлены в отрицательной части графика по оси PC2, а двудольных – в положительной).



**Рисунок 36.** Классификация лигнинов травянистого происхождения (А) и лигнинов древесины лиственных пород (В) методом главных компонент

Наличие галловой кислоты ( $m/z$  169,0141) вносит основной вклад в дисперсию и соответствует PC1-компоненте, описывающей около 42% всех различий. Значительную роль в этом разделении играют соотношения *n*-кумаровой (PC2-компонента) и феруловой кислот (PC3-компонента). Так, для однодольных растений в MS/MS спектре преобладающим ионом является феруловая кислота, а для двудольных – *n*-кумаровая.

Апробация разработанного подхода при анализе tandemных масс-спектров лигнинов, выделенных из лиственных пород древесины, с применением метода главных компонент высших порядков позволила наглядно продемонстрировать различия двух семейств – розоцветные и березовые (рис.36В). Несмотря на то, что MS/MS спектры для лигнинов одного класса растений имеют максимально схожие качественный состав и соотношения интенсивностей преобладающих пиков (с интенсивность более 5%), различия в интенсивностях сигналов минорных ионов (по большей части соответствующих кумариновым структурам, PC5-компонента) позволило успешно разделить данные лигнины и впервые выявить повышенное содержание кумариновых структур в лигнинах розоцветных растений.

Таким образом, анализ tandemных масс-спектров лигнинов методом главных компонент является эффективным способом классификации лигнинов по их ботаническому происхождению. Продемонстрирована перспективность данного способа для более глубокой таксономической классификации внутри отдельных групп растений на основе масс-листа продукт-ионов в ФИАД-МС/МСВР спектрах.

### **5.3 Установление элементных составов высокомолекулярных олигомеров лигнина в масс-спектрах методом Кендрика**

Как было продемонстрировано выше, при точности определения величин  $m/z$  на уровне 1–3 ppm, характерной для масс-анализаторов на основе орбитальной ионной ловушки, однозначное определение элементных составов лигнинных олигомеров возможно для молекулярных масс, не превышающих 700–1000 Да в зависимости от используемой величины разрешающей способности прибора и вводимых ограничений на количество и соотношение элементов. Преодоление этой проблемы возможно за счет прослеживания в составе смесей лигнинных олигомеров отдельных гомологических рядов и определения элементных составов

их представителей с высокими массами на основе брутто-формулы низкомолекулярных членов ряда. Подход основывается на кардинально более высокой точности определения разницы молекулярных масс ( $\Delta m/z$ ) ближайших гомологов для выявления гомологического ряда по сравнению с определением абсолютной величины  $m/z$  каждого олигомера с высокой молекулярной массой. Реализация этого подхода основывается на применении концепции дефектов масс Кендрика (разд. 1.4.3).

В настоящем исследовании обработку масс-спектров и получение списка пиков осуществляли с порогом относительной интенсивности равной 5%. Точно измеренные величины  $m/z$  ионов пересчитывались в массу Кендрика (МК), номинальную массу Кендрика (НМК) и дефект масс Кендрика (ДМК) согласно следующим формулам (1-3):

$$\text{МК (ион)} = \frac{m}{z} (\text{ион}) * \frac{\text{целочисленное значение массы (базовая единица)}}{\text{точная масса (базовая единица)}} \quad (1)$$

$$\text{НМК(ион)} = \text{целочисленное значение (МК(ион))} \quad (2)$$

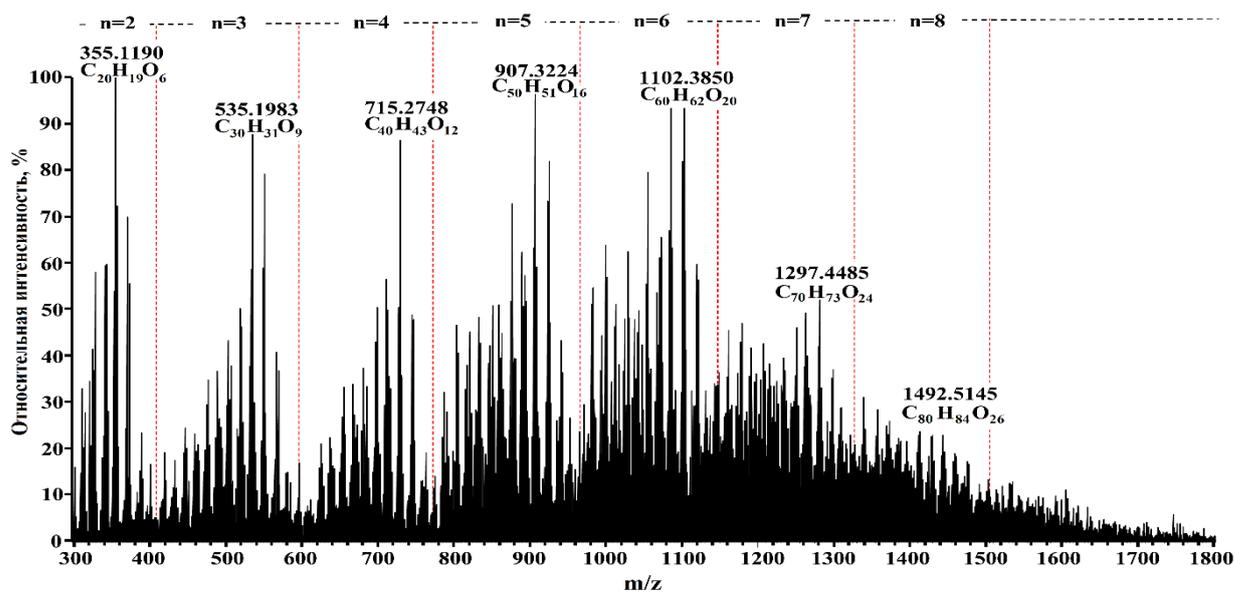
$$\text{ДМК(ион)} = \text{НМК(ион)} - \text{МК(ион)} \quad (3)$$

### 5.3.1 Модификация одномерных графиков дефектов масс Кендрика для визуализации масс-спектров хвойного лигнина

Ключевой проблемой в применении концепции дефектов масс Кендрика для исследования лигнина является выбор базовой структурной единицы Кендрика, на которую отличаются представители гомологического ряда. В отличие от углеводородов нефти и многих других сложных объектов, для которых в качестве базовой единицы используется метиленовая группа [197], для лигнина выбор такого звена неочевиден.

На рисунке 37 представлен масс-спектр высокого разрешения диоксанлигнина можжевельника, который содержит порядка 2,5 тыс. депротонированных молекул лигнинных олигомеров. Все пики в спектре объединяются в группы согласно их степени полимеризации. Так на спектре пунктирными линиями показаны группы пиков, соответствующие димерам ( $m/z$  300 – 400), тримерам ( $m/z$  400 – 600), тетрамерам ( $m/z$  600 – 780), пентамерам

( $m/z$  780 – 980), гексамерам ( $m/z$  980 – 1150), гептамерам ( $m/z$  1150 – 1350) и октамерам ( $m/z$  1350–1500) лигнина. Масса одного структурного звена примерно составляет 196 Да, что соответствует массе гваяцилпропановой структуры общей формулы  $C_{10}H_{12}O_4$ , как преобладающему звену в лигнине можжевельника, согласно результатам Пиро-ГХ/МС.

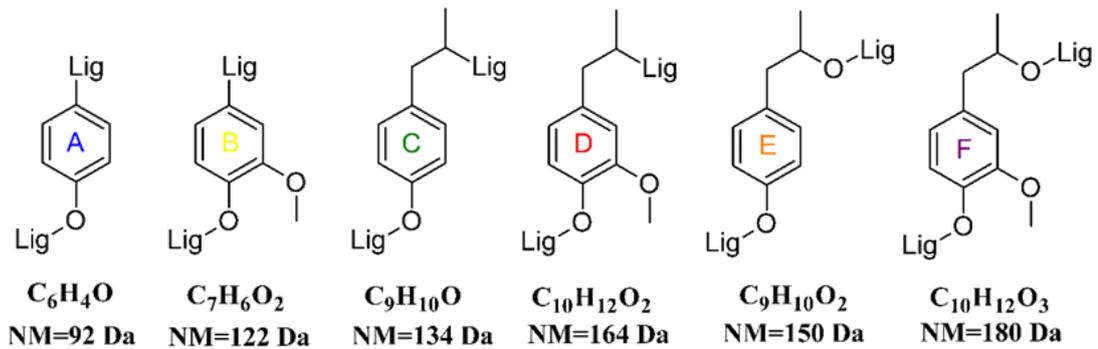


**Рисунок 37.** Масс-спектр лигнина можжевельника, полученный в режиме допированной диоксаном фотоионизации при атмосферном давлении в диапазоне  $m/z$  300–1800

Для получения более подробной структурной информации об образующихся олигомерах лигнина, требуется использование методов тандемной масс-спектрометрии, что затруднительно при наличии изобарных ионов и низкой интенсивности пиков соединения в высоких массах. При этом с ростом молекулярной массы олигомеров резко возрастает количество возможных элементных составов ионов [197], которые подбираются автоматически, без учета структурных особенностей анализируемого образца. Все это осложняет интерпретацию получаемых масс-спектров.

Учитывая, что природный лигнин в своей основе имеет фенилпропановые структурные звенья с гваяцильным ароматическим ядром (характерным для хвойных лигнинов), нами был модифицирован классический подход к определению дефектов масс с использованием  $CH_2$  структурной базовой единицы [199], путем использования структур фенола [ $C_6H_4O$ ], метоксифенола [ $C_7H_6O_2$ ], 4-

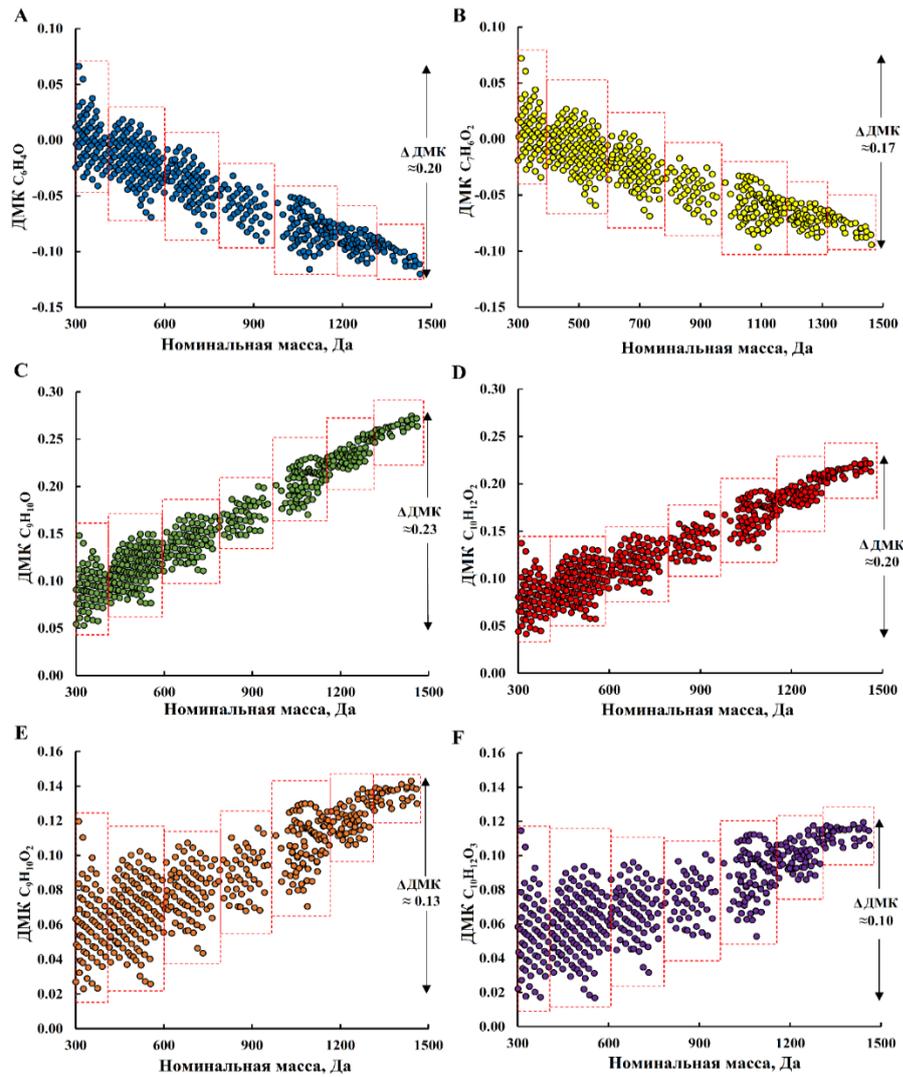
пропилфенола  $[C_9H_{10}O]$ , 2-метокси-4-пропилфенола  $[C_{10}H_{12}O_2]$ ,  
 4-(2-гидроксипропил)фенола  $[C_9H_{10}O_2]$  и 4-(2-гидроксипропил)-2-метоксифенола  
 $[C_{10}H_{12}O_3]$  (Рис. 38).



**Рисунок 38.** Структуры фенольных базовых единиц Кендрика для анализа лигнина

Используя данные базовые единицы, были построены диаграммы дефектов масс Кендрика (рис. 34), а также рассчитаны дефекты масс для различных структурных элементов лигнина с использованием модифицированных базовых единиц (табл. 18).

Для всех опробованных базовых звеньев структура полученных диаграмм (рис. 39) повторяет структуру масс-спектра лигнина (рис. 37) в зависимости от степени полимеризации. Аналогично исходному масс-спектру разграничиваются зоны димеров – октамеров, которые далее могут быть масштабированы для более детального анализа. При этом расположение точек на диаграмме зависит от сложности использованной базовой структурной единицы. Добавление в структуры базовых единиц метоксильных группировок приводит к уменьшению диапазона ДМК, в которых располагаются наборы точек на графиках. Так, смена базовой единицы фенола (структура А) на метоксифенол (структура В) сужает диапазон ДМК с 0,20 до 0,17 (рис. 39А и 39В), за счет уменьшения вклада в дефект масс метоксильных группировок.



**Рисунок 39.** Сравнение диаграмм дефектов масс для диоксанлигнина можжевельника с применением различных базовых единиц

Внедрение в структуру базовой единицы пропановой цепочки (структуры С-Ф) смещает расположение точек на диаграмме в положительную область дефектов масс Кендрика. Добавление в структуры дополнительного кислорода (в качестве гидроксильного заместителя в пропановой цепи) по аналогии с метоксильным заместителем значительно сужает область ДМК на величину 0,1, что наглядно можно наблюдать на рисунках 39С-Е или 39D-Ф. Уменьшение области ДМК позволяет располагать больше точек на параллельных оси номинальных масс прямых и при этом никак не снижает дифференциацию компонентов лигнина разного функционального состава (табл. 21).

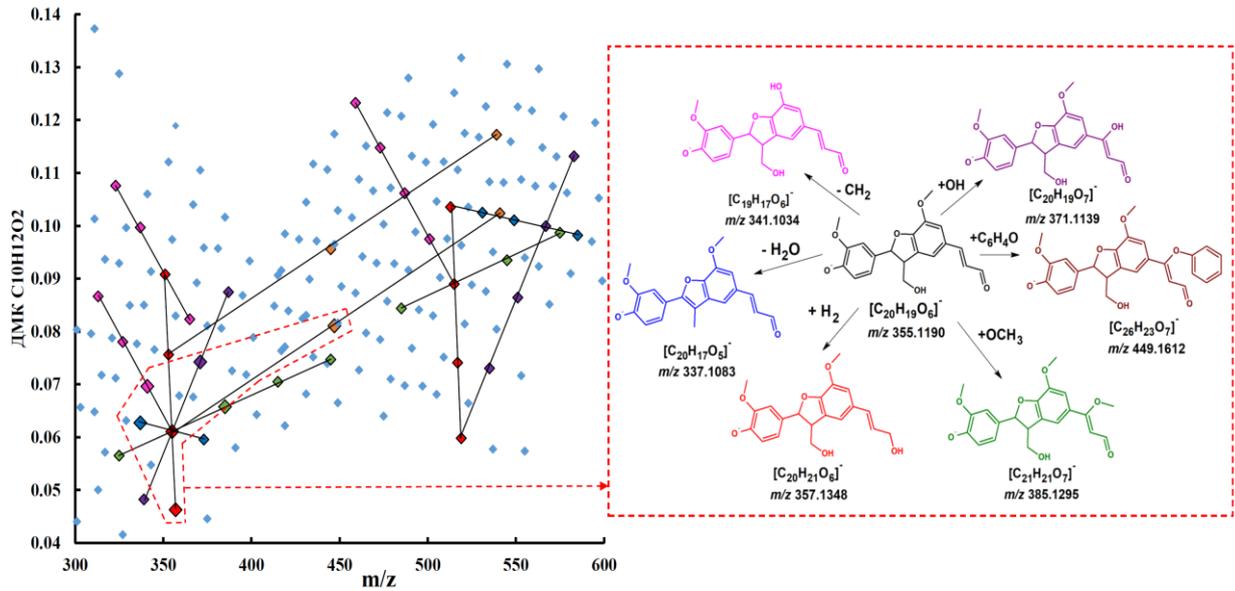
**Таблица 21.** Расчет дефектов масс Кендрика для структурных элементов лигнина с использованием различных базовых единиц

<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O] базовой единицы</b>			
<b>Компонент</b>	<b>Номинальная масса</b>	<b>Масса Кендрика</b>	<b>ДМК</b>
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,011	- 0,011
H <sub>2</sub> O	18	18,005	- 0,005
CH <sub>2</sub> O	30	30,002	- 0,002
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	92,000	0,000
O	16	15,987	0,013
<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>] базовой единицы</b>			
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,011	- 0,011
H <sub>2</sub> O	18	18,005	- 0,005
CH <sub>2</sub> O	30	30,001	- 0,001
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	91,998	0,002
O	16	15,990	0,010
<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O] базовой единицы</b>			
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,007	- 0,007
H <sub>2</sub> O	18	18,000	0,000
CH <sub>2</sub> O	30	29,994	0,006
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	91,976	0,024
O	16	15,986	0,014
<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>] базовой единицы</b>			
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,008	- 0,008
H <sub>2</sub> O	18	18,001	- 0,001
CH <sub>2</sub> O	30	29,995	0,005
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	91,979	0,021
O	16	15,986	0,014
<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>] базовой единицы</b>			
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,008	- 0,008
H <sub>2</sub> O	18	18,002	- 0,002
CH <sub>2</sub> O	30	29,996	0,004
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	91,984	0,016
O	16	15,987	0,013
<b>Расчет дефектов масс для [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>] базовой единицы</b>			
H <sub>2</sub>	2	2,014	- 0,014
CH <sub>2</sub>	14	14,009	- 0,009
H <sub>2</sub> O	18	18,002	- 0,002
CH <sub>2</sub> O	30	29,997	0,003
C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O	92	91,986	0,014
O	16	15,987	0,013

### 5.3.2. Анализ олигомеров лигнина с применением модифицированных диаграмм Кендрика

Детальный анализ полученных диаграмм Кендрика позволяет выявить определенные тенденции в расположении точек. Данные тенденции обусловлены наличием в составе лигнина большого количества гомологов, которые отличаются друг от друга на ту или иную функциональную группу. Структурно-связанные соединения в исследованном образце можно определить по этим тенденциям, так как ряды гомологичных соединений имеет свою собственную линию тренда со своим характерным наклоном по отношению к оси номинальной массы. Последовательность точек на таких прямых фиксирована по величине как по оси номинальной массы, так и по оси дефекта масс.

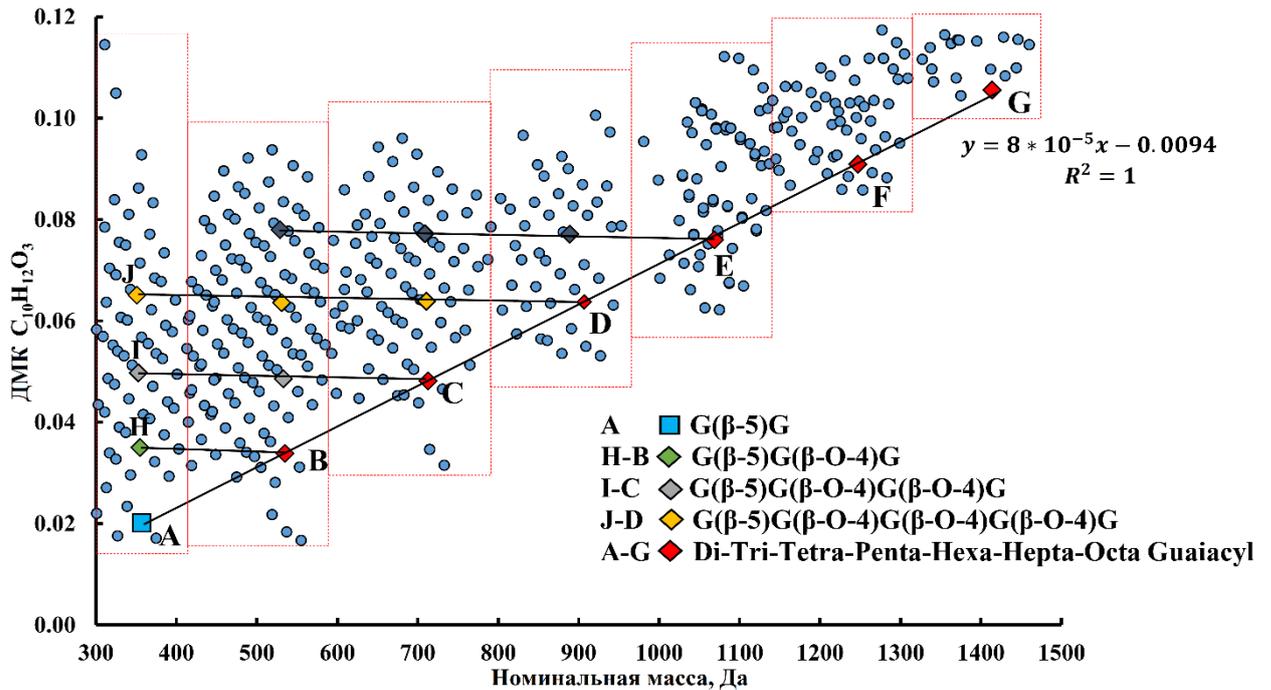
Проведено масштабирование области (рис. 40), охватывающей диапазон  $m/z$  300–600 (димеры-тримеры) на диаграмме D (рис. 39). В качестве исходной точки нами был выбран ион с  $m/z$  355,1194 (самый интенсивный пик в спектре лигнина можжевельника), который соответствует димерной структуре с фенилкумарановой связью, являющейся устойчивой к фрагментации в источнике (по результатам записи МС/МС-спектра) и соответствует структуре баланофолина. Через данную точку можно провести ряд прямых, которые будут характеризовать присоединение или отщепление различных функциональных групп. Так, на графике (рисунок 40) фиолетовые точки соответствуют соединениям, содержащим различное число гидроксильных групп (последовательность точек будет отличаться на величину 16 Да по оси X и на величину 0,014 Да по оси Y), зеленые – метоксильных, сиреневые – метильным звеньям, красные – количество двойных связей, синие – присоединение/отщепление воды. Линия, соединяющая темно-оранжевые точки и пересекающая область димеров-тримеров-тетрамеров, содержит последовательность соединений с разным количеством фенольных колец.



**Рисунок 40.** Визуализация фрагмента масс-спектра хвойного лигнина в «модифицированной» диаграмме дефектов масс Кендрика. Цветные точки на диаграмме соответствуют ряду гомологов отличающихся: на  $\text{H}_2$  (красные);  $\text{OCH}_3$  (зеленые);  $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$  (оранжевые);  $\text{O}$  (фиолетовые);  $\text{CH}_2$  (сиреневый);  $\text{H}_2\text{O}$  (синий).

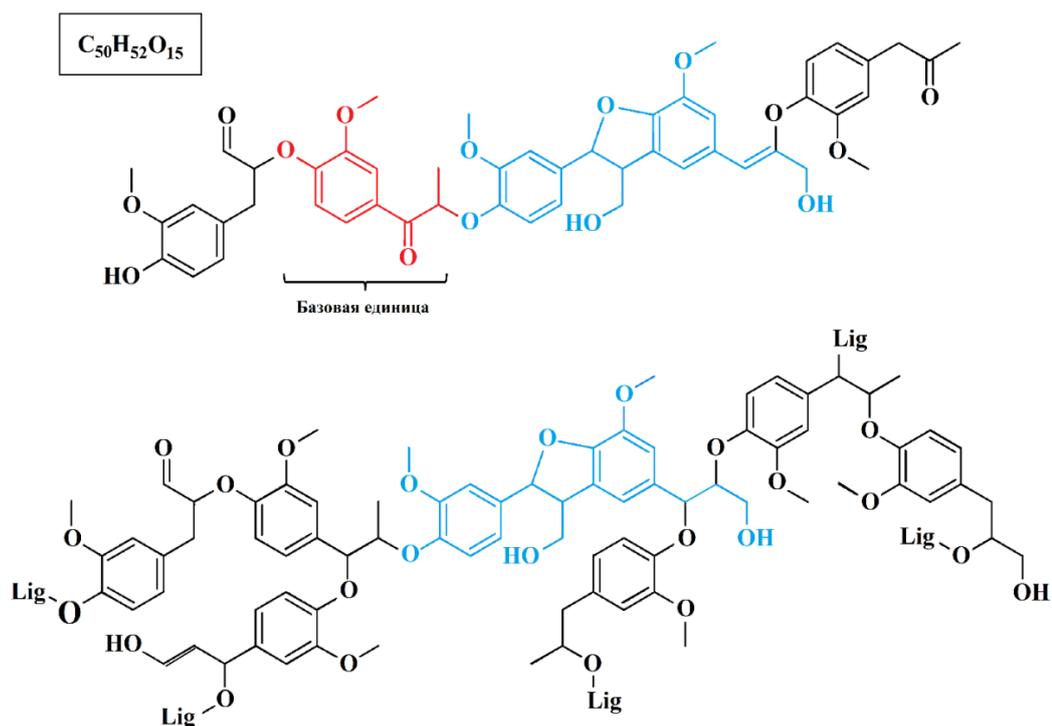
Таким образом, все точки на диаграмме можно объединить в единую сеть взаимосвязанных структурных элементов. Чтобы изучить структуры олигомеров с более высокими массами, тот же набор данных был визуализирован с применением 4-(2-гидроксипропил)-2-метоксифенольной базовой единицы.

На рисунке 40 горизонтальными линиями (H-B, I-C, J-D) представлены последовательности олигомеров лигнина (разделённых вдоль оси ординат на  $\pm\text{H}_2$ ), отличающихся на структурное звено  $[\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3]$ . Такие последовательности пересекают область димеров-пентамеров, что не достигалось с использованием других базовых структурных единиц, исследуемых в этой работе. Также наблюдается линейная зависимость A-G ( $R^2=1$ ), соединяющая последовательность точек гваяцильных субъединиц исследуемого лигнина из димерной до октамерной области. Использование в качестве базовой единицы 4-(2-гидроксипропил)-2-метоксифенола также позволяет различать компоненты лигнина разного функционального состава (табл. 18).



**Рисунок 41.** Пример использования модифицированной шкалы ДМК с 4-(2-гидроксипропил)-2-метоксифенольной базовой единицей для анализа структуры олигомеров лигнина в диапазоне  $m/z$  300-1500

Используя имеющиеся трендовые зависимости на диаграммах Кендрика, возможно воссоздать структуры образующихся олигомеров с высокими массами (как это показано на рисунке 42) по известным ранее данным или после предварительного фрагментирования отдельных ионов (мономеров или димеров) и установления начальных структур. Так, из исходного иона с  $m/z$  357 (точка А на рисунке 41) путем последовательных трансформации согласно полученной диаграмме была смоделирована структура пентамера (C<sub>50</sub>H<sub>52</sub>O<sub>15</sub>) лигнина можжевельника (точка D на рисунке 41), которая представлена на рисунке 38. Дальнейшее наращивание молекулярной массы может происходить путем присоединения гваяцильных звеньев через образование  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4-связей, как показано на рисунке 37.



**Рисунок 42.** Предполагаемая структура пентамера и фрагмент макромолекулы лигнина можжевельника, полученные на основе ДМК

Одно из основных преимуществ применения концепции дефектов масс Кендрика – возможность идентификации олигомеров с высокими массами, для которых правильное определение достоверных элементных составов на основе точной массы уже затруднительно. Как видно из таблицы 22, идентификация серии гомологичных соединений, отличающихся на различное число структурных блоков  $C_{10}H_{12}O_4$  в масс-спектре можжевельника, значительно облегчается путем преобразования в массу Кендрика с последующим пересчётом дефекта масс. Разница между величинами дефектов масс для данной серии соединений одинакова, иными словами, каждый член данной серии имеет один и тот же «добавочный структурный элемент». В низких массах точность определения элементных составов достаточно высока, что позволяет нам определить структурную разницу между близлежащими элементами данной серии (в данном случае это  $C_{10}H_{12}O_4$ ). Рост молекулярной массы увеличивает число вариантов элементных составов, что приводит к их искажениям. Выявление гомологических рядов с использованием концепции Кендрика позволяет определить элементные составы олигомеров с высокими массами.

**Таблица 22.** 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>
<hr/>				
333,0781	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	332,954	0,046	C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>
529,1517	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>	528,955	0,046	C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>
725,2257	C <sub>40</sub> H <sub>37</sub> O <sub>13</sub>	724,956	0,045	C <sub>40</sub> H <sub>37</sub> O <sub>13</sub>
921,3002	C <sub>43</sub> H <sub>53</sub> O <sub>22</sub>	920,957	0,043	C <sub>50</sub> H <sub>49</sub> O <sub>17</sub>
1117,374	C <sub>53</sub> H <sub>65</sub> O <sub>26</sub>	1116,958	0,042	C <sub>60</sub> H <sub>61</sub> O <sub>21</sub>
1313,448	C <sub>63</sub> H <sub>77</sub> O <sub>30</sub>	1312,959	0,041	C <sub>70</sub> H <sub>73</sub> O <sub>25</sub>
<hr/>				
319,0990	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>	318,9802	0,020	C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub>
515,1725	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>8</sub>	514,9807	0,020	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>8</sub>
711,2461	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> O <sub>12</sub>	710,9812	0,019	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> O <sub>12</sub>
907,3215	C <sub>43</sub> H <sub>55</sub> O <sub>21</sub>	906,9836	0,017	C <sub>50</sub> H <sub>51</sub> O <sub>16</sub>
1103,395	C <sub>53</sub> H <sub>67</sub> O <sub>25</sub>	1102,984	0,016	C <sub>60</sub> H <sub>63</sub> O <sub>20</sub>
1299,468	C <sub>63</sub> H <sub>79</sub> O <sub>29</sub>	1298,984	0,015	C <sub>70</sub> H <sub>75</sub> O <sub>24</sub>

Кроме того, графики результатов анализа ДМК не ограничиваются использованием только базовых единиц C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>, но могут быть адаптированы к использованию и других функциональных блоков. Процесс фотоионизации в источнике сопровождается деструктивными изменениями структуры лигнинов и образованием множества ионов, отличающихся друг от друга той или иной функциональной группой. Олигомеры, различающиеся определенной функциональной группой (ОН, СН<sub>2</sub>, ОСН<sub>2</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.36).

Последовательность точек на таких прямых фиксируется по величине как по оси номинальной массы, так и по оси дефекта массы. Например, единицы [ОСН<sub>2</sub>] были использованы для поиска ряда олигомеров лигнина, которые различаются числом метоксильных групп, таких как кумаровая кислота, феруловая кислота и синаповая кислота. На увеличенной части графика ДМК с использованием единиц [C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>] эта группа олигомеров лигнина соединена зелеными линиями (рис. 36).

Точки на диаграмме равноудалены друг от друга на 30 Да по оси абсцисс и ДМК 0,0005 по оси ординат. Аналогичным образом на графике были обнаружены другие серии олигомеров (таблица 23).

**Таблица 23.** Расчет ДМК для тримерной области масс-спектра лигнина можжевельника

m/z (эксп.)	Относительная интенсивность, %	ДМК	ΔДМК	Формула [M–H] <sup>+</sup>
<b>+ H<sub>2</sub></b>				
541,1157	4	0,086	- 0,0150	C <sub>30</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>
543,1315	7	0,071		C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>
545,1472	12	0,056		C <sub>30</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>
547,1628	26	0,041		C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>
549,1783	50	0,026		C <sub>30</sub> H <sub>29</sub> O <sub>10</sub>
551,1939	42	0,011		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>10</sub>
553,2095	6	-0,003		C <sub>30</sub> H <sub>33</sub> O <sub>10</sub>
<b>+ O</b>				
519,2042	8	-0,011	+ 0,0110	C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>8</sub>
535,1990	44	0,000		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub>
551,1939	42	0,011		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>10</sub>
567,1890	17	0,022		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>11</sub>
583,1840	6	0,033		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub>
<b>+ OCH<sub>2</sub></b>				
431,1514	3	0,009	+ 0,0005	C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>6</sub>
461,1622	10	0,010		C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> O <sub>7</sub>
491,1728	18	0,010		C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> O <sub>8</sub>
521,1835	29	0,011		C <sub>29</sub> H <sub>29</sub> O <sub>9</sub>
551,1939	42	0,011		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>10</sub>
581,2049	7	0,012		C <sub>31</sub> H <sub>33</sub> O <sub>11</sub>
611,2156	3	0,012		C <sub>32</sub> H <sub>35</sub> O <sub>12</sub>
<b>+ CO</b>				
523,1990	6	-0,004	+ 0,0150	C <sub>29</sub> H <sub>31</sub> O <sub>9</sub>
551,1939	42	0,011		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>10</sub>
579,1890	7	0,027		C <sub>31</sub> H <sub>31</sub> O <sub>11</sub>
607,1841	8	0,042		C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>12</sub>
635,1791	18	0,057		C <sub>33</sub> H <sub>31</sub> O <sub>13</sub>
<b>+ CH<sub>2</sub></b>				
467,1001	3	0,074	- 0,0110	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>
481,1156	6	0,064		C <sub>25</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>
495,1314	10	0,053		C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub>
509,1471	14	0,042		C <sub>27</sub> H <sub>25</sub> O <sub>10</sub>
523,1628	28	0,032		C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>
537,1783	22	0,022		C <sub>29</sub> H <sub>29</sub> O <sub>10</sub>
551,1939	42	0,011		C <sub>30</sub> H <sub>31</sub> O <sub>10</sub>

Таким образом модифицирование классического метода Кендрика для изучения лигнинов позволяет не только визуализировать составы данных сложных объектов с поиском гомологических рядов, но и также играет важную роль в возможности упрощения масс-спектров с целью построение структур олигомеров лигнина.

### **Заключение к главе 5**

Построение диаграмм ван Кревелена позволило получить «образы» исследуемых лигнинов в диаграммах элементных соотношений O/C к H/C, где каждая область диаграммы соответствует определенному классу соединений. В составе препаратов малоизмененного лигнина наблюдается четыре основные группы: типичные олиголигнолы со средней брутто-формулой  $C_{10}H_{10}O_3$ , структуры гваяцилглицерина, лигноуглеводные комплексы и конденсированные полиароматические соединения. По изменению «образов» молекулярного состава можно судить о протекающих в лигнине реакциях в ходе различных процессов.

Применение метода главных компонент позволило выявить специфические пики в масс-спектрах, характерные для конкретных лигнинов и успешно классифицировать их ботаническому происхождению.

Применение концепции дефектов масс Кендрика, с использованием в качестве базовых структур звеньев на основе фенилпропановых единиц, значительно упрощает визуализацию получаемых массивов масс-спектрометрических данных. Рассмотренный в данной работе метод был впервые применен для структурной характеристики олигомеров малоизменённого хвойного лигнина на примере можжевельника. На основе полученных диаграмм получены брутто-формулы олигомеров с высокими молекулярными массами и смоделированы предполагаемые структуры лигнинных соединений на основе гваяцилпропановых звеньев, соединённых между собой  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 связями.

## ГЛАВА 6. МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АНАЛИЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ ПРИРОДНЫХ ЛИГНИНОВ<sup>3</sup>

Разработанные и описанные в гл. 3–5 методы и подходы к характеристике молекулярного состава и структуры лигнинов использованы нами для исследования трех малоизученных лигнинов, выделенных их травянистых растений (крапива, осока), а также из флоэмы березы. Лигнины травянистых растений привлекают возрастающее внимание исследователей в связи с ростом интереса к вовлечению быстрорастущего однолетнего растительного сырья в хозяйственный оборот как возобновляемого источника целлюлозы и разнообразных соединений, альтернативного не только ископаемым ресурсам, но и древесному сырью. При этом до сих пор подавляющее большинство исследований лигнина фокусировалось именно на препаратах, выделяемых из древесины, а лигнинам трав внимание практически не уделялось. Выбор крапивы и осоки в качестве объектов нашего исследования обусловлен исключительной распространенностью данных растений, а также высоким потенциалом их применения в промышленности. Биомасса крапивы находит широкое применение в создании косметических и лекарственных препаратов, а важной особенностью

---

<sup>3</sup> При подготовке данной и последующих глав диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные результаты, положения и выводы исследования:

1. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Фалёва А.В., Шаврина И.С., Кожевников А.Ю., Ульяновский Н.В. Изучение лигнина осоки (*Carex*) методами масс-спектрометрии высокого разрешения и спектроскопии ядерного магнитного резонанса // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2020. – № 10. – С. 2004–2012. Импакт-фактор – 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 (*Carex*) lignin by high-resolution mass spectrometry and NMR spectroscopy // Russian Chemical Bulletin, International Edition. – 2020. – Vol. 69, N 10. – P. 2004–2012, DOI: 10.1007/s11172-020-2992-3. (Импакт-фактор Web of Science – 1.222, Q3), 40%.

2. **Пиковской И.И.**, Косяков Д.С., Шаврина И.С., Ульяновский Н.В. Изучение лигнина крапивы (*Urtica dioica*) 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 dioica*) Lignin by Atmospheric Pressure Photoionization Orbitrap Mass Spectrometry // Journal of Analytical Chemistry. – 2019. – Vol. 74, N 14. – P. 1412–1420, DOI: 10.1134/S1061934819140090. (Импакт-фактор Web of Science – 1.069, Q4), 40 %.

3. 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. – Vol. 14, N 5. – P. 964 – 979, DOI: 10.3390/polym14050964 (Импакт-фактор Web of Science – 4.329, Q1), 40 %.

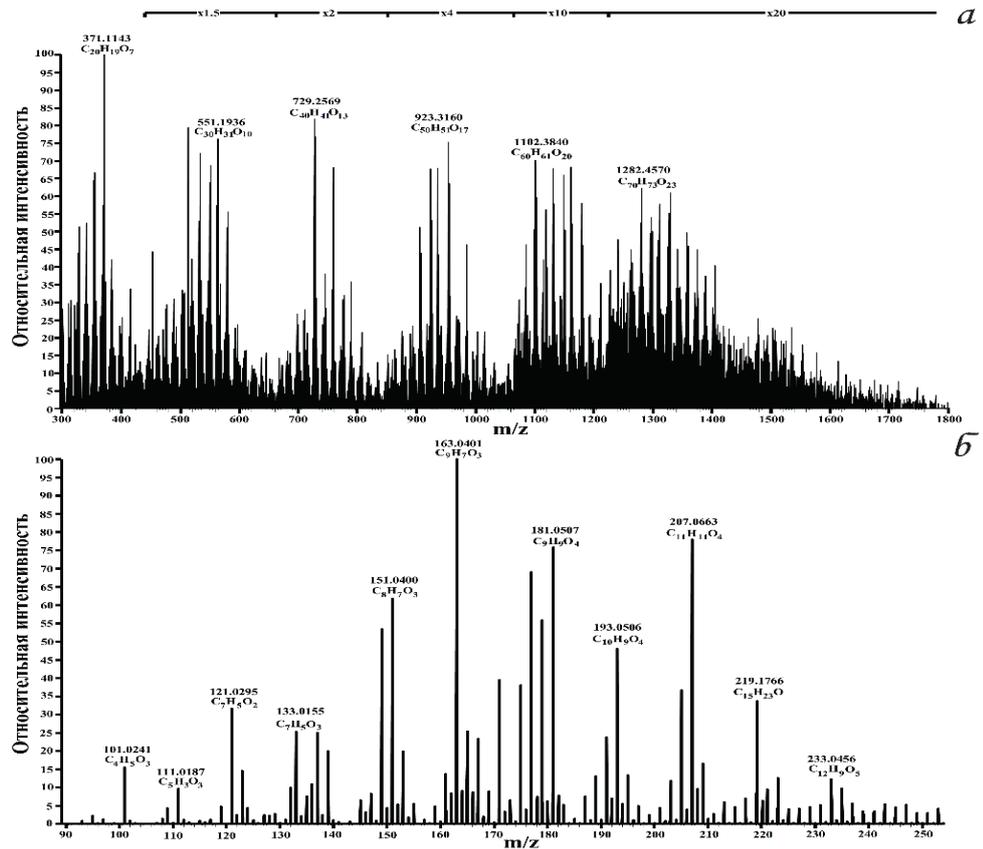
осоки является и то, что это растение является важнейшим торфообразователем и изучение структуры и химического состава его компонентов вносит вклад в понимание процессов образования природных гуминовых веществ. Лигнин флоэмы древесных растений также практически не изучен в отличие от лигнина ксилемы. При этом знание его структурных особенностей открывает возможности для более глубокого понимания процессов биосинтеза лигнина и специфики построения различных тканей растения. С практической точки зрения изучение лигнина флоэмы вносит вклад в совершенствование процессов химической переработки крупнотоннажных отходов деревообрабатывающей и целлюлозно-бумажной промышленности, особенно коры березы, в наибольших масштабах образующейся в качестве отхода фанерных производств.

### 6.1 Анализ лигнина крапивы

Масс-спектр полученного препарата лигнина крапивы насчитывает порядка трех тысяч пиков депротонированных молекул  $[M-H]^-$  олигомеров с относительной интенсивностью более 0,1%. (Рисунок 43а).

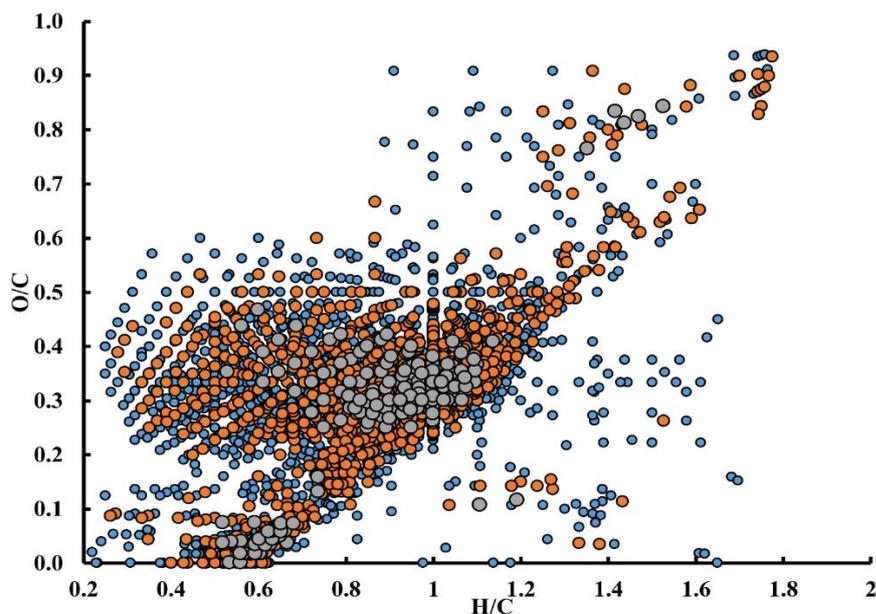
Пики в масс-спектре объединяются в группы, соответствующие олигомерам с различной степенью полимеризации. Расстояние между группами пиков варьируется в диапазоне от 190 до 210 Да. Спектр в области малых масс (Рисунок 43б), включает преимущественно пики мономерных ароматических кислот и фенолов. Обращает на себя внимание преобладание среди них коричных кислот – *n*-кумаровой и феруловой ( $m/z$  163,0401 и 193,0506), а также, вероятно, 3,4-диметоксикоричной ( $m/z$  207,0663) и 3,4-дигидроксидигидрокоричной (дигидрокофейной) с  $m/z$  181,0506.

Расчет элементных составов всех олигомеров, детектируемых в диапазоне  $m/z$  300–1000 (димеры – пентамеры), на основе их точных масс и представление результатов в координатах ван Кревелена позволили получить «образ» исследуемого препарата диоксанлигнина крапивы (рис. 44). Как и в случае с хвойным древесным лигнином, в котором также преобладают звенья G-типа, для основной массы олигомеров характерна область элементных составов  $H/C = 0,6–1,2$  и  $O/C = 0,2–0,6$ . Это свидетельствует о повышенной доле окисленных ароматических структур, содержащих карбонильные и карбоксильные группы.



**Рисунок 43.** Масс-спектр диоксанлигнина крапивы, полученный в режиме допированной диоксаном фотоионизации при атмосферном давлении: а – в диапазоне  $m/z$  300 – 1800, б – в диапазоне  $m/z$  90 – 250

Для детальной характеристики мономерных структурных единиц лигнина крапивы нами использован предложенный подход (Глава 5), основанный на получении масс-спектра (МС/МС) продуктов ДАС множества ионов-предшественников в широком диапазоне  $m/z$ , выделяемом квадрупольным масс-фильтром. Для его реализации выбрана область  $m/z$  300–1000 и величина энергии соударения 10 эВ, позволившая обеспечить широкий спектр ионов-продуктов с молекулярными массами 90–250 Да (табл. 24).



**Рисунок 44.** Диаграмма ван Кревелена для диоксанлигнина крапивы. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пиков в масс-спектре (синий 0.1-1%, оранжевый 1-10%, серый > 10%)

Как и в соответствующей области  $MS^1$  спектра, основные пики полученного тандемного масс-спектра соответствуют оксикоричным кислотам – *n*-кумаровой (максимальная интенсивность сигнала), феруловой и дигидроферуловой, на долю которых приходится более трети суммарной интенсивности пиков всех мономеров. Наличие среди продуктов ДАС такого количества фенилпропановых кислот является весьма специфичным признаком. Исключительно высокая интенсивность пика *n*-кумаровой кислоты (около 25% от суммарной интенсивности) свидетельствует в пользу того, что на неё приходится как минимум основная масса структур H-типа в изучаемом препарате лигнина.

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  $C_8H_8O$ , которое, наиболее вероятно, представляет собой 4-винилфенол, но может быть также ацетофеноном или фенилкумараном, 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 –

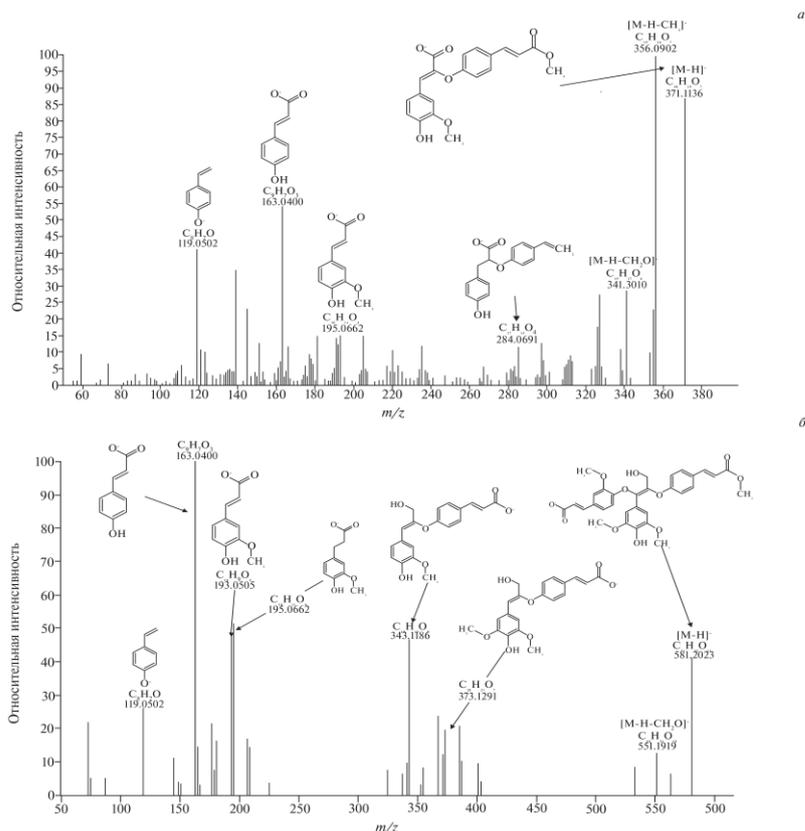
глиоксалевой ( $C_2H_2O_3$ ), гликолевой ( $C_2H_4O_3$ ) и пировиноградной ( $C_3H_4O_3$ ), образующиеся при отщеплении боковых цепей фенилпропановых структур.

**Таблица 24.** Основные фрагменты, образующиеся в ходе ДАС депротонированных молекул диоксанлигнина крапивы (ионы-предшественники с  $m/z$  300–1000, энергия соударений 10 эВ)

Предполагаемые структуры	[M-H] <sup>-</sup>	$m/z$ (эксп.)	$m/z$ (теор.)	$I_{отн}$ , %
Гидроксibenзол (фенол)	$C_6H_6O$	93,0344	93,0334	5
дигидроксibenзол	$[C_6H_4O_2]^-$	108,0216	108,0217	19
2-фуранкарбоновая кислота	$[C_5H_3O_3]^-$	111,0087	111,0088	19
гидроксиметилфуран	$[C_5H_5O_3]^-$	113,0245	113,0244	37
ацетофенон, 4-винилфенол, кумаран	$[C_8H_7O]^-$	119,0503	119,0502	47
гидроксibenзохинон	$[C_6H_3O_3]^-$	123,0088	123,0088	21
гваякол	$[C_7H_7O_2]^-$	123,0453	123,0451	11
метоксифуральдегид	$[C_6H_5O_3]^-$	125,0244	125,0244	11
4-Метоксибензальдегид	$[C_8H_7O_2]^-$	135,0441	135,0453	13
2,3-дигидроксibenзальдегид	$[C_7H_5O_3]^-$	137,0233	137,0244	10
ванилин	$[C_8H_7O_3]^-$	151,0404	151,0401	20
сирингол, ванилиновый спирт	$[C_8H_9O_3]^-$	153,0558	153,0557	7
<i>n</i> -кумаровая кислота	$[C_9H_7O_3]^-$	163,0403	163,0401	100
2,3-Диметоксибензальдегид	$[C_9H_9O_3]^-$	165,0558	165,0546	20
4-метоксикоричная кислота	$[C_{10}H_9O_3]^-$	177,0558	177,0557	17
ацетосирингон, кофейная кислота	$[C_9H_7O_4]^-$	179,0350	179,0350	40
сиреневый альдегид, дигидрокофейная кислота	$[C_9H_9O_4]^-$	181,0507	181,0506	17
феруловая кислота	$[C_{10}H_9O_4]^-$	193,0509	193,0506	19
дигидроферуловая кислота	$[C_{10}H_{11}O_4]^-$	195,0667	195,0663	24
3,4-диметоксикоричная кислота	$[C_{11}H_{11}O_4]^-$	207,0663	207,0662	6

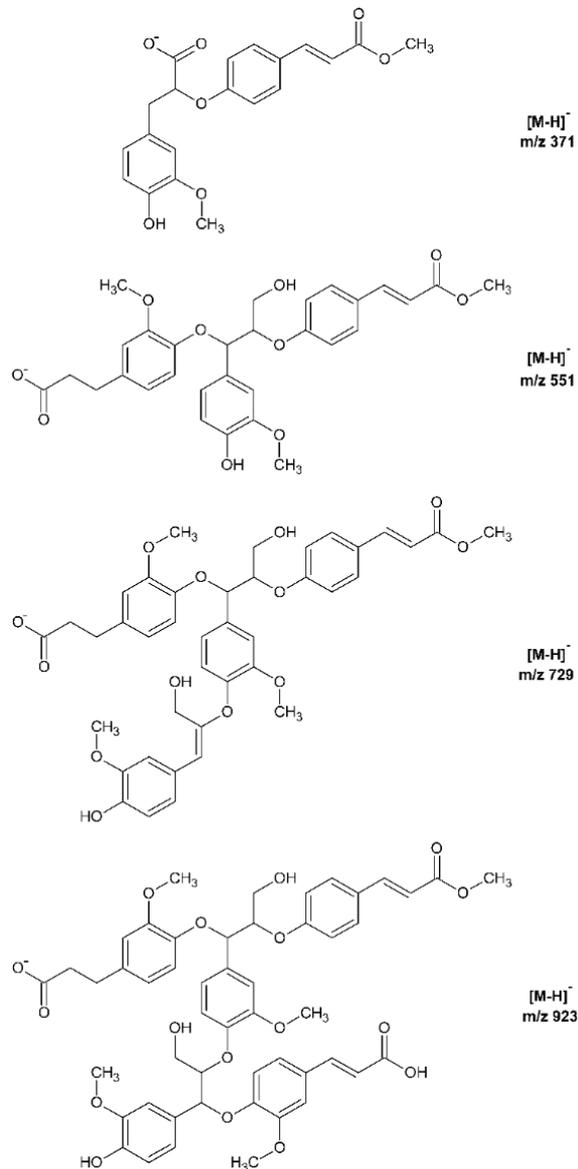
Наиболее ценная информация о строении олигомеров лигнина может быть получена при изучении тандемных масс-спектров отдельных ионов-предшественников. Решение такой задачи осложняется, с одной стороны, наличием большого количества изомерных и изобарных структур, выделение которых в индивидуальном виде для последующей ДАС невозможно при помощи квадрупольного масс-фильтра, а с другой стороны, нереалистичностью их предварительного хроматографического разделения. Для детальной

характеризации мономерных структурных единиц лигнина крапивы нами использован подход, основанный на получении масс-спектра (МС/МС) продуктов диссоциации, активированной соударениями отдельных ионов-предшественников в узком диапазоне  $m/z$  (рисунок 45), выделяемом квадрупольным масс-фильтром. Для экспериментов были выбраны два иона с  $m/z$  371,1136 (димер  $[C_{20}H_{19}O_7]^+$ ) и  $m/z$  581,2023 (тример  $[C_{31}H_{33}O_{11}]^+$ ).



**Рисунок 45.** Масс-спектры продуктов активированной соударениями диссоциации димера с  $m/z$  371 (а) и тримера с  $m/z$  581 (б) с предполагаемыми путями их фрагментации (энергия соударений 30 эВ)

Полученные МС/МС спектры (рис. 45) 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  $m/z$  163,0400 и 193,0505 соответствуют *n*-кумаровой и феруловой кислотам. На спектре тримера обнаруживается также интенсивный пик с  $m/z$  195,0662, который может быть отнесен к дигидроферуловой кислоте. На основе данных тандемной масс-спектрометрии предложены возможные структурные формулы исследуемых олигомеров (рис. 46).



**Рисунок 46.** Предполагаемые структурные формулы депротонированных молекул ди-, три-, тетра- и пентамера с  $m/z$  371, 551, 729 и 923 в препарате диоксанлигнина крапивы

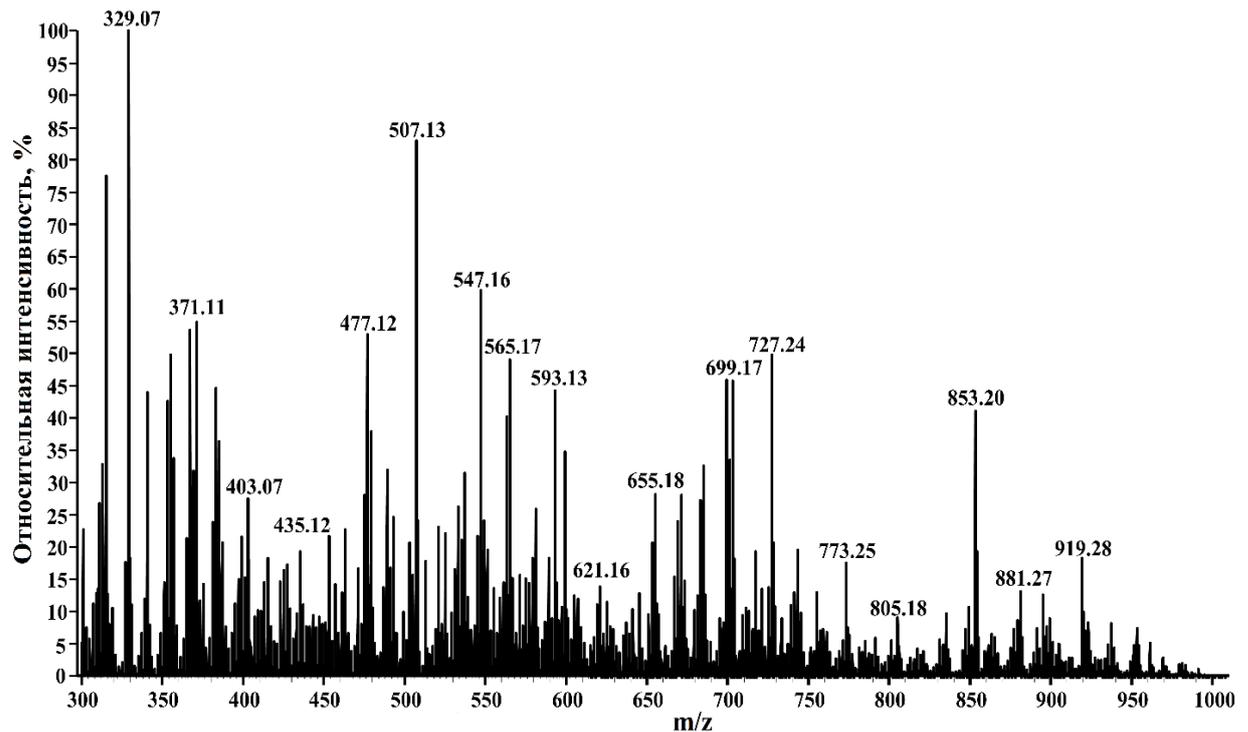
В структуру димера предположительно входят дигидроферуловая и *n*-кумаровая кислоты, образующие  $\beta$ -O-4 связь. Одна из карбоксильных групп может быть этерифицирована метанолом, на что указывает потеря метильной группы с образованием иона, дающего интенсивный сигнал при  $m/z$  356,0902. Предполагаемая структура тримера имеет в своей основе сирингилпропановую структуру, соединённую  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 связями с фенольными гидроксильными группами дигидроферуловой и *n*-кумаровой кислот. Нарращивание макромолекулярной цепи возможно за счет дальнейшей этерификации фенольной гидроксильной группы сирингилпропанового или гваяцилпропанового звена и

присоединением нового остатка кислоты с образованием дополнительных  $\alpha$ -O-4 и  $\beta$ -O-4 связей. Это позволяет объяснить формирование последовательности наблюдаемых в МС<sup>1</sup> спектре (рис. 43А) интенсивных пиков депротонированных молекул три-, тетра- и пентамера с  $m/z$  551,1936, 729,2560, 923,3160 соответственно. Альтернативным вариантом может являться увеличение степени полимеризации за счет этерификации карбоксильных групп оксикоричных кислот с получением линейных макромолекул.

## 6.2 Характеристика структуры лигнина осоки

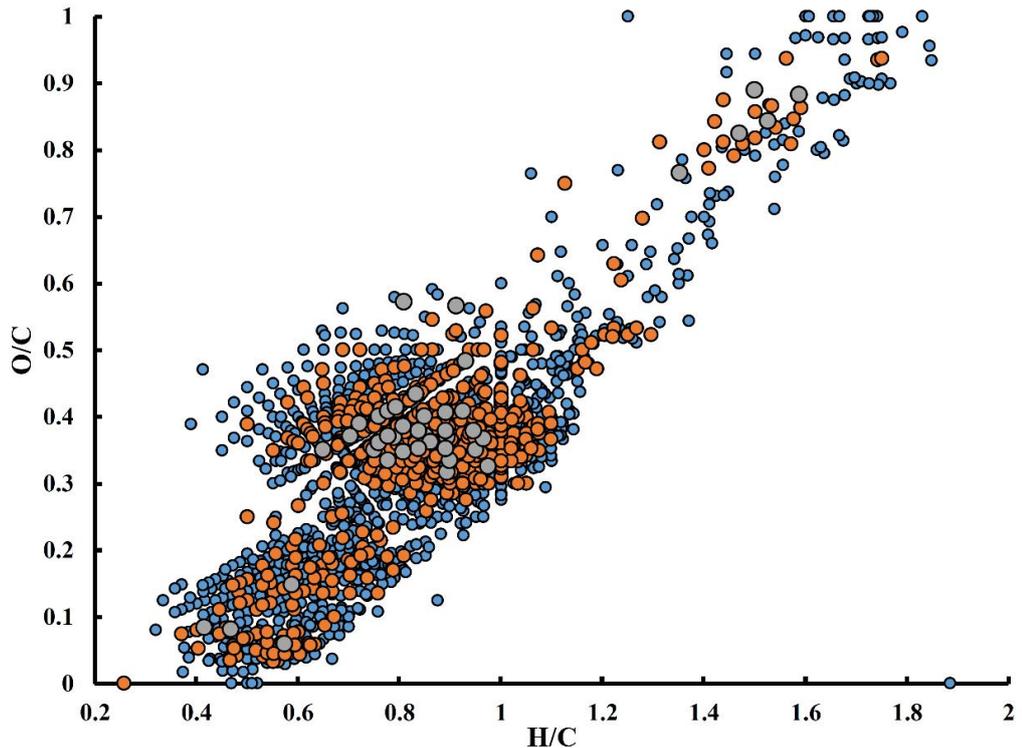
Учитывая всю сложность исследуемых полимеров, для их непосредственного анализа необходимо использовать наиболее современные и мощные аналитические инструменты, в том числе сочетать разные методы, которые уже успешно зарекомендовали себя для анализа лигнинов, для более комплексного анализа и рассмотрения одного объекта с различных сторон. В этом плане, помимо традиционных деградационных методов анализа лигнинов, в настоящее время основную роль играет спектроскопия ЯМР, в основном, в двумерном варианте. Сочетание МСВР и спектроскопии ЯМР с одной стороны позволяет охарактеризовать олигомерные фракции лигнина, выдвинуть предположения о преобладающих структурах и мономерных звеньях (путем применения тандемной масс-спектропии), а с другой стороны охарактеризовать как олигомерные фракции могут быть связаны друг с другом, а также подтвердить или опровергнуть наличие тех или иных структур.

Масс-спектр полученного препарата диоксанлигнина осоки (рис. 47) характеризуется высокой сложностью и содержит в своем составе порядка 2 тысяч пиков индивидуальных соединений с  $I_{\text{отн}} > 0,1\%$  в диапазоне  $m/z$  до 1,0 кДа.



**Рисунок 47.** Масс-спектр диоксанлигнина осоки, полученный в режиме допированной диоксаном фотоионизации при атмосферном давлении в диапазоне  $m/z$  300–1000

Визуализации полученных данных по элементным составам всех лигнинных олигомеров на диаграмме ван Кревелена (рис. 48) позволила выделить 3 основных типа структур. Центральная область диаграммы (О/С 0,25-0,55 и Н/С 0,4-1,2) соответствует типичным лигнинным олигомерам (производные гваяцил-, сингил- и *n*-гидроксифенилглицерина) и кумарановым структурам. В области О/С 0,0-0,25 и Н/С 0,3-0,8 проявляются конденсированные ароматические структуры (в том числе образующиеся при частичной деградации лигнина в условиях ФИАД/МС). В области высоких содержаний кислорода (О/С 0,6–1,0) и малых величинах степени ненасыщенности (Н/С 1,2-1,8) располагаются лигноуглеводные комплексы, образующиеся за счет наличия ковалентных связей фенилпропановых звеньев с моносахаридами и гемицеллюлозами. Полученный нами «образ» исследуемого препарата диоксанлигнина осоки в координатах ван Кревелена в целом соответствует результатам масс-спектрометрического исследования диоксанлигнина крапивы. Основное отличие заключается в менее выраженной области, соответствующей сильноненасыщенным кислородсодержащим структурам.



**Рисунок 48.** Диаграмма ван Кревелена для диоксанлигнина осоки. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пиков в масс-спектре (синий 0.1-1%, оранжевый 1-10%, серый > 10%)

Для детальной характеристики мономерных структурных единиц лигнина осоки использован подход, основанный на получении тандемных масс-спектров (с использованием ДАС) множества ионов предшественников в широком диапазоне  $m/z$ , выделяемом квадрупольным масс-фильтром. Для его реализации выбрана область олигомеров с  $m/z$  300–1000 и величина энергии соударения 10 эВ. Основные образующиеся фрагменты представлены в табл. 25.

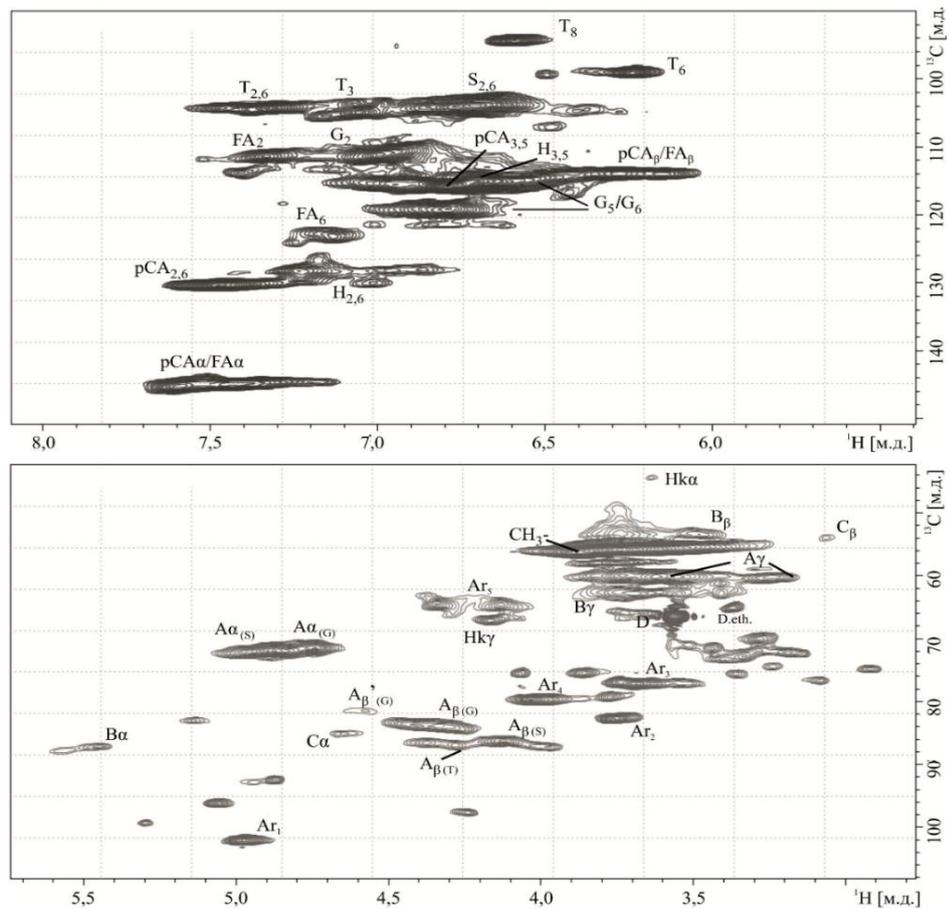
Кроме пиков мономерных соединений лигнина, в тандемных масс-спектрах наблюдаются также сигналы углеводов. Среди них наибольшей интенсивностью отличается пик иона, соответствующего брутто-формуле пентоз  $C_5H_{10}O_5$  ( $[M-H]^-$  с  $m/z$  149,0464).

**Таблица 25.** Основные фрагменты, образующиеся в ходе ДАС депротонированных молекул диоксанлигнина осоки (ионы-предшественники с  $m/z$  300–1000, энергия соударений 10 эВ)

Предполагаемые структуры	[M-H] <sup>-</sup>	$m/z$ (эксп.)	$m/z$ (расч.)	$\Delta$ , ppm	I <sub>отн.</sub> , %
Гидроксibenзол (фенол)	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O	93,0344	93,0334	-2,41	10
Гидрокси метилфуран	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	113,0245	113,0244	1,08	83
Метилфенилкетон (ацетофенон)	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O	119,0503	119,0491	0,55	40
2-Метокси фенол (гваякол)	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	123,0453	123,0451	0,89	10
4-Метокси бензальдегид (анисовый альдегид)	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub>	135,0441	135,0453	1,01	13
2,3- Дигидрокси бензальдегид	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	137,0233	137,0245	0,76	10
4-окси-3- метокси бензальдегид (ванилин)	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	151,0404	151,0401	2,02	30
<i>n</i> -Оксикоричная кислота ( <i>n</i> -кумаровая кислота)	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	163,0403	163,0401	1,02	100
2,3- Диметокси бензальдегид	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	165,0558	165,0546	0,74	27
4-Метокси коричная кислота	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub>	177,0558	177,0557	0,43	24
Кофейная кислота	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179,0350	179,0350	0,35	30
4-гидрокси-3,5- диметокси бензальдегид (сиреневый альдегид)	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	181,0507	181,0506	0,41	18
3-метокси-4- гидрокси коричная кислота (феруловая кислота)	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	193,0509	193,0506	1,51	80
Дигидроферуловая кислота	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	195,0667	195,0663	1,93	15

В силу естественных ограничений масс-спектрометрического подхода, не позволяющих получать надежную информацию о связях между структурными фрагментами макромолекул, для решения этой задачи использован метод двумерной спектроскопии ЯМР (рисунок 49). Область спектров ( $\delta_C/\delta_H$  50–90/2,6–5,8) дает полезную информацию о различных межблочных связях, характерных для

исследуемого лигнина, а перекрёстные сигналы в ароматической области HSQC спектра ( $\delta_C/\delta_H$  100–160/6,0–8,0) соответствуют различным структурным единицам лигнина.



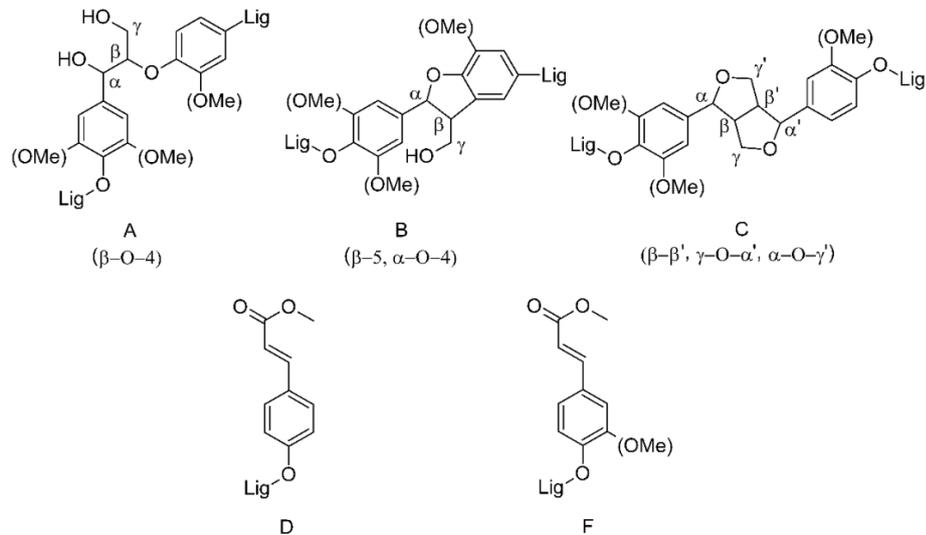
**Рисунок 49.** Двумерный HSQC ЯМР-спектр диоксанлигнина осоки

Интерпретация (табл. 24) и количественная оценка спектров HSQC ЯМР позволили установить, что лигнин осоки содержит все три типа фенилпропановых единиц (H / G / S) в соотношении 21:57:22, что хорошо согласуется с результатами, полученными методом Пиро-ГХ-МС (табл. 5) и ФИАД-МС/МС (табл. 26). Данная характеристика показывает также сходство исследуемого препарата с лигнинами других травянистых растений HGS-класса, для которых также характерно высокое содержание гваяцильных структур. Еще одним подтверждением сделанного вывода является количество метоксильных групп ( $\delta_C/\delta_H$  55,7/3,7 м.д.), которое в расчете на одно ароматическое ядро близко к 1.

**Таблица 26.** Отнесение корреляционных сигналов в спектрах HSQC ЯМР диоксанлигнина осои

Обозначение	$\delta_C/\delta_H$ (м.д.)	Структура [199]
H $\alpha$	44,1/3,62	C $\alpha$ -H $\alpha$ в структуре кетона Гибберта
B $\beta$	53,0/3,47	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре фенилкумарана
C $\beta$	53,6/3,05	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре резинола
CH $3$ -	55,5/3,73	C-H метоксильной группы
A $\gamma$	59,8/(3,60;3,23)	C $\gamma$ -H $\gamma$ в структурах $\beta$ -арилового эфира
B $\gamma$	62,5/3,68	C $\gamma$ -H $\gamma$ в структурах фенилкумарана
Ar $_5$	64,2/(4,33;4,12)	C-H в структуре арабинофуранозы
A $\alpha$ (G)	71,1/4,72	C $\alpha$ -H $\alpha$ в структуре $\beta$ -арилового эфира, связанного с единицами G-типа
A $\alpha$ (S)	71,6/4,86	C $\alpha$ -H $\alpha$ в структуре $\beta$ -арилового эфира, связанного с единицами S-типа
Ar $_3$	76,8/3,67	C-H в структуре арабинофуранозы
Ar $_4$	79,4/4,02	C-H в структуре арабинофуранозы
A $\beta'$ (G)	81,1/4,56	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре $\beta$ -арилового эфира, связанного с единицами G-типа и ацелированного в $\gamma$ -положении
Ar $_2$	82,4/3,75	C-H в структуре арабинофуранозы
A $\beta$ (G)	83,6/4,30	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре $\beta$ -арилового эфира, связанного с единицами G-типа
A $\beta$ (S)	85,8/4,11	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре $\beta$ -арилового эфира, связанного с единицами S-типа
B $\alpha$	86,8/5,44	C $\alpha$ -H $\alpha$ в структуре фенилкумарана
Ar $_1$	101,8/4,96	C-H в структуре арабинофуранозы
S $_{2,6}$	103,6/6,70	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ в структуре S-единиц
G $_2$	110,8/6,97	C $_2$ -H $_2$ в структуре G-единиц
FA $_2$	111,0/7,32	C $_2$ -H $_2$ в структуре феруловой кислоты
pCA $\beta$ и FA $\beta$	113,5/6,26	C $\beta$ -H $\beta$ в структуре <i>n</i> -кумаровой и феруловой кислот
G $_5$	114,2/6,78	C $_5$ -H $_5$ в структуре G-единиц
H $_{3,5}$	114,7/6,69	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ в структуре H-единиц
pCA $_{3,5}$	115,4/6,77	C $_{3,5}$ -H $_{3,5}$ в структуре <i>n</i> -кумаровой кислоты
G $_6$	118,7/6,77	C $_6$ -H $_6$ в структуре G-единиц
FA $_6$	122,8/7,12	C $_6$ -H $_6$ в структуре феруловой кислоты
H $_{2,6}$	127,9/7,22	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ в структуре H-единиц
pCA $_{2,6}$	129,9/7,45	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ в структуре <i>n</i> -кумаровой кислоты
pCA $\alpha$ и FA $\alpha$	144,6/7,48	C $\alpha$ -H $\alpha$ в структуре <i>n</i> -кумаровой и феруловой кислот

Исключительно интенсивные сигналы  $\delta_C/\delta_H$  145,0/7,5 и 115,0/6,5 м.д. (рис. 49) соответствуют  $\alpha$  и  $\beta$  атомам пропановой цепи *n*-кумаровой (рис. 50D) и феруловой кислот (рис. 50 F), а сигналы при  $\delta_C/\delta_H$  130,5/7,4 и 116,2/6,8 м.д. относятся к ароматическому кольцу коричных кислот, что убедительно подтверждает описанные выше результаты масс-спектрометрического эксперимента по установлению продуктов фрагментации лигнинных олигомеров (табл. 26).



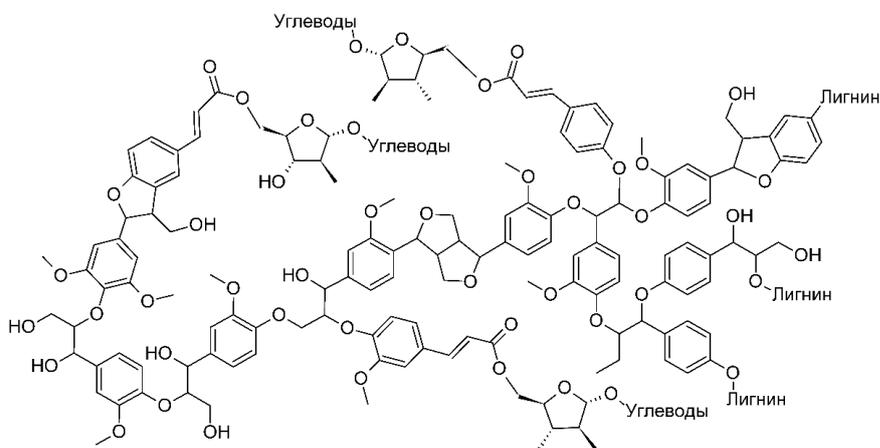
**Рисунок 50.** Основные структуры присутствующие в диоксанлигнине осоки, выявленные с помощью HSQC 2D-ЯМР: (A) димерные структуры, образованные  $\beta$ -O-4 связью; (B) фенолкумарановые структуры, образованные  $\beta$ -5,  $\alpha$ -O-4 связями; (C) пинорезинольные структуры, образованные связями  $\beta$ - $\beta'$ ,  $\gamma$ -O- $\alpha'$ ,  $\alpha$ -O- $\gamma'$ ; (D) структура кумаровой кислоты; (F) структура феруловой кислоты

Основные димерные структуры, присутствующие в лигнине осоки, образуются за счет формирования  $\beta$ -O-4 связи (рис. 50, структура A), на ее долю приходится порядка 80% всех связей между фенолпропановыми звеньями. Она идентифицируется на основе интенсивных корреляционных сигналов  $\delta_C/\delta_H$  60,1/3,5 (рис. 49, A $\alpha$ ) и  $\delta_C/\delta_H$  71,1/4,7 м.д. (рис. 49, A $\beta$ ) и соединяет между собой гваяцильные, *n*-гидроксифенильные и сиригильные структурные единицы. Следующими по распространенности являются фенолкумарановые структуры (рис. 50, структура B), о чем свидетельствуют корреляционные сигналы в HSQC-спектре с  $\delta_C/\delta_H$ : 86,9/5,5, 53,2/3,5 и 62,6/3,7 м.д., относимые к  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -положению структуры B соответственно. Интенсивность сигналов пинорезинольных структур (рис. 50, структура C) весьма невелика и их можно рассматривать как минорные

для лигнина осоки в отличие от лигнинов древесных растений. Соответствующие им корреляционные сигналы наблюдаются при  $\delta_C/\delta_H$  85,3/4,6, 53,9/3,0 и 71,5/4,2 м.д. и относятся к  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -положению этих фрагментов.

Особое внимание следует уделить множественным сигналам в ЯМР-спектрах, относящимся к углеводам (например,  $\delta_C/\delta_H$  64,2/4,33, 64,2/4,12, 76,8/3,67, 101,8/4,96 м.д.). Наиболее интенсивные из них относятся к структуре арабинофуранозы, вовлечённой в образование сложноэфирной связи с гидроксикоричными кислотами. Последние, таким образом, выступают в качестве связующих звеньев лигнина и полисахаридов, образуя с ними соответственно  $\beta$ -О-4 (по фенольной гидроксильной группе) и сложноэфирные (по карбоксильной группе) связи.

На основе описанных выше результатов возможный вариант структуры типичного олигомерного фрагмента макромолекулы лигнина осоки может быть выражен формулой, представленной на рисунке 51 и соответствующей элементному составу фенолпропанового биополимера (исключая углеводные остатки в структуре макромолекулы)  $C_{10}H_{10,3}O_{3,1}$  в расчете на гваяцилпропановое звено.



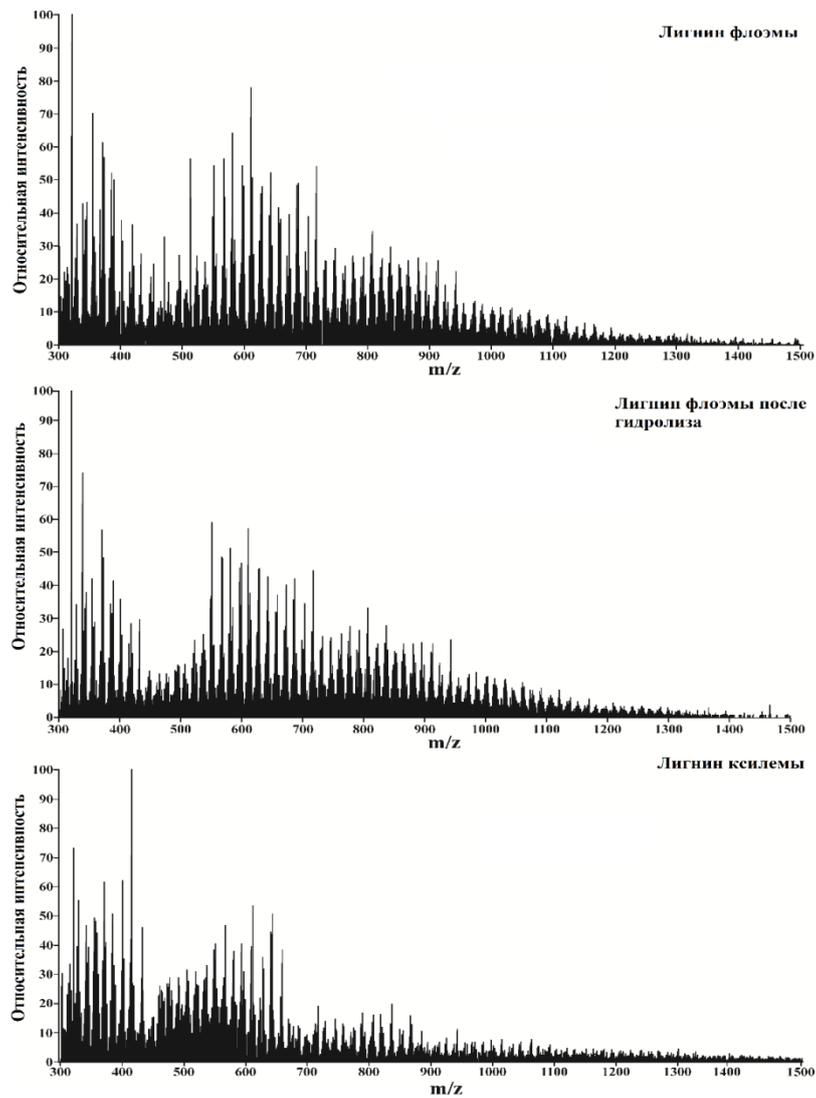
**Рисунок 51.** Предполагаемая структура макромолекулы лигнина осоки

### 6.3 Молекулярный анализ лигнина флоэмы березы

Подавляющее большинство исследований лигнинов древесных растений, имеющих в литературе, проводили на препаратах, выделенных из ксилемы. В то же время лигнин коры все еще остаются малоизученными, хотя кора является многотоннажным отходом целлюлозно-бумажной промышленности и деревообрабатывающих производств. Среди них наибольшее значение имеют

лигнин внутренней коры (флоэмы), которая в отличие от ксилемы является живой тканью растения, изучение которой позволяет по-новому взглянуть на процессы биосинтеза лигнина. В связи со спецификой химического состава флоэмы были изучены три препарата лигнина: образец, полученный в виде диоксанового лигнина ксилемы (ДЛК) по методу Пеппера; образец, полученный в виде диоксанового лигнина флоэмы (ДЛФ) по методу Пеппера; образец диоксанового лигнина флоэмы после предварительного щелочного гидролиза (ДЛФГ) флоэмы, для удаления полифенольной составляющей.

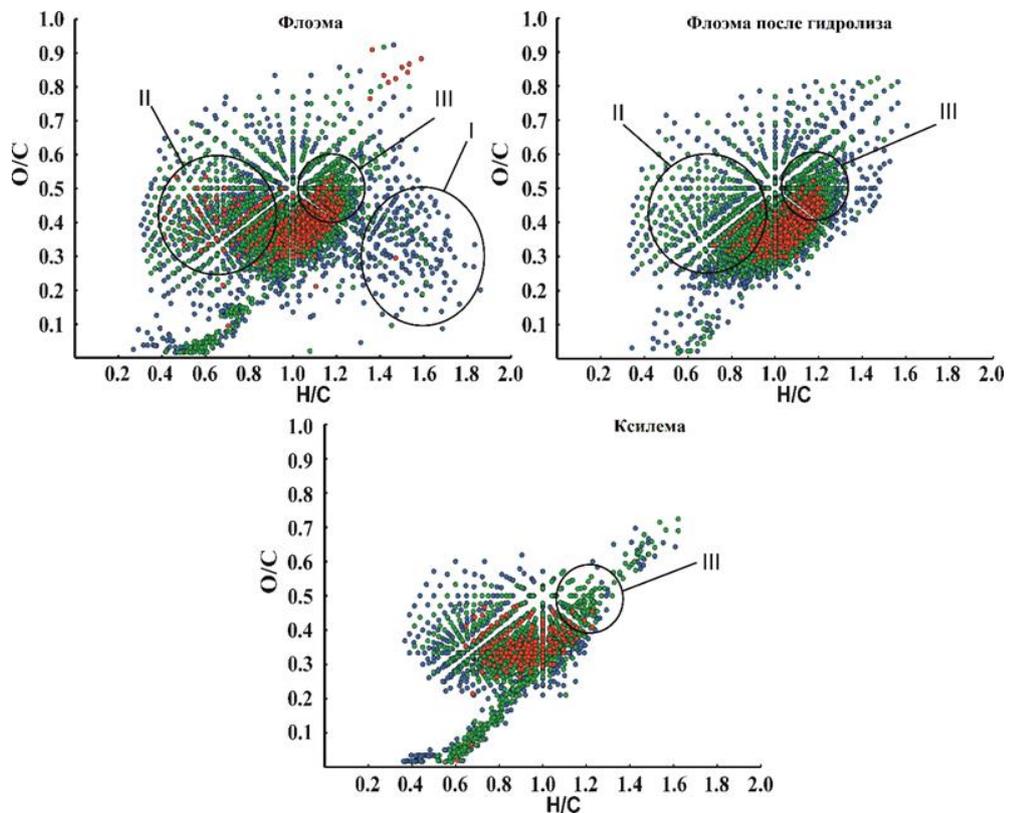
Масс-спектры ФИАД-МСВР трех исследованных препаратов лигнина (рис. 52) содержат до 3000 пиков, соответствующих в основном депротонированным молекулам в диапазоне  $m/z$  300–1500 и имеют схожий внешний вид. Четыре широких пиковых кластера, соответствующих олигомерам лигнина с разной степенью полимеризации (от димеров с  $m/z$  300–450 до пентамеров с  $m/z$  950–1200) можно визуально пронаблюдать на полученных масс-спектрах. Их центры удалены друг от друга на расстояние 200–250 Да, которое соответствует массе сингилпропанового звена, характерного для лигнинов лиственной древесины с высоким содержанием S-звеньев. Отличительная черта масс-спектров лигнина флоэмы – наличие высокомолекулярных фракций с сигналами в диапазоне  $m/z$  700–1300. Это согласуется с показаниями Пиро-ГХ/МС о составе мономеров лигнина (раздел 2.4, табл. 5) и, следовательно, более высокой степенью конденсации. Другая причина тесно связана с более высокой способностью к конденсации и повышенным содержанием С-С межблочных связей в фенилкумарановых структурах, которые гораздо более стабильны в условиях ФИАД по сравнению с легко разрушаемыми алкил-арилэфирными связями.



**Рисунок 52.** Масс-спектры диоксанлигнина ксилемы и флözмы березы

Более детальное представление о химическом составе лигнина как сложного объекта на молекулярном уровне было получено путем визуализации элементных соотношений всех обнаруженных соединений в координатах ван Кревелена (рис. 53). Очевидное отличие образца ДЛФ от других является наличие большого количества сигналов от структур с низкой степенью ненасыщенности (область I,  $N/C = 1,4-1,8$ ), а также набором интенсивных пиков в области II. Первые можно легко отнести к примесям липидов и жирных кислот, а вторые соответствуют в основном полифенольным веществам. Среди них самые интенсивные сигналы в масс-спектре принадлежат ионам с  $m/z$  301,0354 и 303,0511, которые соответствуют элементным составам  $[C_{15}H_9O_7]^+$  и  $[C_{15}H_{11}O_7]^+$ . Они были отнесены к кверцетину и дигидрокверцетину, а надежность идентификации кверцетина была

подтверждена данными тандемной масс-спектрометрии и их сравнением со спектром его аналитического стандарта. Ионы, соответствующие этим структурам, были также обнаружены в масс-спектрах ДЛФГ и ДЛК, однако их интенсивность была в 4–5 раз ниже, чем в спектре ДЛФ. Обе эти области на графике ван Кревелена исчезают после щелочной обработки флоэмы, делая «изображение» ДЛФГ химического состава близкому к препарату лигнина ксилемы. Отличительной особенностью обоих препаратов лигнина флоэмы является наличие области III ( $H/C = 1,0–1,3$ ,  $O/C = 0,4–0,6$ ), с интенсивными сигналами от соединений с более высоким содержанием кислорода и несколько более низким значением ненасыщенности по сравнению с типичными олигомерами лигнина, выделенными из ксилемы березы. Целевой поиск соответствующих пиков в масс-спектрах показал, что они принадлежат в основном соединениям с высоким молекулярными массами ( $> 600$  Да) и могут соответствовать гваяцилглицериновым структурам или гликолизированным олигомерам лигнина.



**Рисунок 53.** Визуализация молекулярных составов лигнина флоэмы и ксилемы в диаграммах ван Кревелена. Цвет точек соответствует относительной интенсивности пика в масс-спектре:  
0,1–1% (синий), 1–10% (зеленый), 10–100% (красный)

Применение разработанного подхода ФИАД-МС/МСВР для ионов-предшественников с молекулярной массой 300–1000 Да позволило обнаружить среди полученных мономерных фрагментов углеводы (табл. 27). 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 (табл.5, раздел 2.4).

Метод ФИАД-МСВР впервые позволил получить ценную информацию о химическом составе и строении малоизученного лигнина березовой флоэмы, являющийся многотоннажным побочным продуктом деревообработки и перспективным сырьем для биопереработки. 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 сингильными ( $S/G = 0,7-0,9$ ), которая обеспечивает более высокую степень конденсации за счет образований связей C-C, включающих 5-е положение в ароматическом фенилпропановом звене.

Таблица 27. Мономерный состав лигнина ксилемы и флоэмы березы

Предполагаемые структуры	[М-Н] <sup>-</sup>	m/z	Относительная интенсивность, %		
			ДЛК	ДЛФ	ДЛФГ
4-Гидроксифуранон	[C <sub>4</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	99,0087	34	15	37
Малоновая кислота	[C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	103,0036	43	46	51
Пирокатехин	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	109,0284	20	17	9
Гидроксиметилфуранон	[C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	113,0245	94	46	64
4-Гидроксибензальдегид	[C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	121,0284	8	7	6
Гваякол	[C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	123,0441	8	8	7
Пирогаллол	[C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	125,0245	9	13	13
4-Гидроксиацетофенон	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>-</sup>	135,0441	4	5	3
4-Гидроксибензойная кислота	[C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	137,0233	21	41	46
p-Гидроксифенилглиоксаль	[C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	149,0244	15	22	21
Ксилоза	[C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	149,0451	2	8	8
Ванилин	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	151,0401	35	28	30
3,4-Дигидроксибензойная кислота	[C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	153,0195	12	17	15
Кумаровая кислота	[C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	163,0400	10	9	13
4-Гидрокси-3-метоксибензойная кислота	[C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	167,0338	23	15	21
Кониферилловый альдегид	[C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	177,0557	12	8	11
p-Гидрокси-3-метоксифенилглиоксаль	[C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	179,0352	25	19	21
2,4'-Дигидрокси-3-метоксиацетофенон	[C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	181,0508	37	13	17
3-Метокси-4-гидроксикумаровая кислота	[C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	193,0507	39	26	34
3,5-Диметокси-4-гидроксиацетофенон	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	195,0664	15	12	11
Синаповый альдегид	[C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	207,0664	22	7	7
p-Гидрокси-3,5-диметоксифенилглиоксаль	[C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	209,0457	21	9	13
2,4'-Дигидрокси-3',5'-диметоксиацетофенон	[C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	211,0615	16	8	7
Синаповая кислота	[C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>-</sup>	223,0614	30	15	10

Сложность химического состава диоксанлигнина флоэмы также связана с наличием в его составе флавоноидов (конденсированных дубильных веществ) и липидов (жирных кислот), которые можно удалить во время предварительного щелочного гидролиза растительного сырья. Использование метода тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения позволило продемонстрировать тот факт, что флавоноиды не входят в состав лигнина и могут рассматриваться как примесные соединения, извлекаемые вместе с лигнином из тканей флоэмы. Значительную роль

в формировании строения лигнина флоэмы березы играют лигноуглеводные комплексы, в которых D-ксилопираноза является преобладающим углеводным фрагментом.

### **Заключение к главе 6**

Метод масс-спектрометрии высокого разрешения с орбитальной ионной ловушкой и допированной диоксаном фотоионизацией при атмосферном давлении впервые использован для характеристики структуры лигнинов травянистых растений на примере диоксанлигнина крапивы двудомной и осоки. Показана перспективность сочетания масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР как взаимодополняющих методов для максимально полной структурной характеристики лигнинов. Полученные масс-спектры содержат около 3 000 пиков депротонированных молекул лигнинных олигомеров в диапазоне молекулярных масс до 1,6 кДа. Изучение тандемных масс-спектров и компонентного состава мономеров, образующихся в ходе активированной соударениями диссоциации макромолекул лигнина травянистых растений, показало особую роль *n*-оксикоричных кислот в формировании структуры лигнина. На основе результатов тандемной масс-спектрометрии предложены возможные структуры олигомеров лигнина крапивы, образующихся за счет присоединения гваяцил- и сирингилпропановых структур с их последующей этерификацией *n*-кумаровой, феруловой и дигидроферуловой кислотами, а сочетание метода ФИАД-МС с двумерной спектроскопией ЯМР позволило предположить возможную структуру лигнина осоки.

Применение метода ФИАД-МСВР позволило сравнить молекулярные составы лигнинов ксилемы и флоэмы, выделенных из одного типа сырья – древесины березы. Показано, что оба лигнина характеризуются одинаковым набором мономерных структур, однако для лигнина флоэмы характерна более конденсированная структура из-за преобладания G-фрагментов в структуре макромолекул. Применение ФИАД-МС/МСВР позволило продемонстрировать, что наличие полифенольных компонентов в составе флоэмы носит примесный характер, а химические связи полифенолов с лигнином отсутствуют.

## 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

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, сирингильных 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 деградационными 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.

### **Благодарности**

*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.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Heitner C., Dimmel D.R., Schmidt J.A.* Lignin and Lignans: Advances in Chemistry. Boca Raton. CRC Press. 2010. P. 683.
2. *Abe A., Dusek K., Kobayashi S.* Advances in Polymer Science. Springer-Verlag. 2010. P. 212.
3. *Perlack R., Wright L., Turhollow A., Graham R., Stokes B., Erbach D.* Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. 2005. P. 72.
4. *Payen A.* Memoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux // Comptes Rendus. 1838. V. 7. P. 1052.
5. *Schulze F.* Contribution to the knowledge of lignin and its occurrence in the plant body. 1856.
6. *Adler E.* Lignin chemistry - past, present and future // Wood Sci. Technol. 1977. V. 11. № 3. P. 169.
7. *Никитин В.М.* Химия древесины и целлюлозы [Текст] / В.М. Никитин, А.В. Оболенская, В.П. Щеголев. М.: Лесн. пром-сть, 1978. 370 с.
8. *Кретович В.Л.* Основы биохимии растений [Текст] / В.Л. Кретович. 5-е изд., М.: Высш. шк., 1971. 503 с.
9. *Боголицын К.Г.* Физическая химия лигнина [Текст] / К.Г. Боголицын. Академкнига. 2010. 492 с.
10. *Закис Г.Ф.* Функциональный анализ лигнинов и их производных [Текст] / Г.Ф. Закис. Рига: Зинатне, 1987. 230 с.
11. *Кузнецов Б.Н., Кузнецова С.А., Тарабанько В.Е.* Новые методы получения химических продуктов из биомассы деревьев сибирских пород // Российский химический журнал. 2004. Т. 48. № 3. С. 4–19.
12. *Gosselink R.J.A., Jong E., Guran B., Abächerli A.* Co-ordination network for lignin—Standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN) // Ind. Crops Prod. 2004. V. 20, № 2. P. 121–129.
13. *Mohan D., Pittman Jr., Steele P.H.* Single, binary and multicomponent adsorption of copper and cadmium from aqueous solutions on kraft lignin —A biosorbent // J. Colloid Interface Sci. 2006. V. 297. № 2. P. 489–504.

14. *Gellerstedt G., Tomani P., Axegard P., Backlund B.* Lignin recovery and lignin based products // RSC Green Chemistry. 2013. № 18. P. 180–210.
15. *Norgren M., Edlund H.* Lignin: Recent advances and emerging applications // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 2014. V. 19. № 5. P. 409–416.
16. *Macfarlane A.L., Prestidge R., Farid M.M., Chen J. J.* Dissolved air flotation: A novel approach to recovery of organosolv lignin // Chem. Eng. Sci. 2009. V. 148. № 1. P. 15–19.
17. *Wu X., Fan X., Xie S., Lin J., Cheng J., Zhang Q., Chen L., Wang Y.* Solar energy-driven lignin-first approach to full utilization of lignocellulosic biomass under mild conditions // Nature Catal. 2018. V. 1. № 10. P. 772–780.
18. *Rahimi A., Ulbrich A., Coon J.J., Stahl S.S.* Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics // Nature. 2014. V. 515. № 7526. P. 249–252.
19. *Sun Z., Fridrich B., De Santi A., Elangovan S., Barta K.* Bright side of lignin depolymerization: Toward new platform chemicals // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 2. P. 614–678.
20. *Monteil-Rivera F., Phuong M., Ye M., Halasz A., Hawari J.* Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials // Ind. Crops Prod. 2013. V 41. P. 356-364.
21. *Ralph J., Lundquist K., Brunow G., Lu F., Kim H., Schatz P.F., Marita J.M., Hatfield R.D., Ralph S.A., Christensen J.H., Boerjan W.* Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids // Phytochemistry Rev. 2004. V. 3. № 1. P. 29–60.
22. *Зарубин М.Я.* Основы органической химии лигнинов [Текст] / М.Я. Зарубин, С.М. Крутов. СПб.:СПбГЛТА. 2010. 272 с.
23. *Оболенская А.В.* Химия лигнина / А.В. Оболенская. СПб: ЛТА, 1993. 79 с.
24. *Freudenberg K.* Biosynthesis and constitution of lignin // Nature. 1959. V. 183. P. 1152–1155.
25. *Lin Y.S.* Methods in lignin chemistry / Berlin: Springer. 1998. 578 p.
26. *Карманов А.П., Боголицын К.Г., Монаков Ю.Б., Лунин В.В.* Дегидрополимеризация монолигнолов и самоорганизованная критичность // Журнал физической химии. 2003. Т. 77. №12. С. 2277–2282.

27. *Карманов А.П., Монаков Ю.Б.* Лигнин. Структурная организация и фрактальные свойства. // *Успехи химии.* 2003. Т. 72. № 8. С. 797–819.
28. *Ralph J., Lapierre C., Marita J.M. et al.* Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR // *Phytochemistry.* 2001. V. 57. № 6. P. 993–1003.
29. *Ralph J., Landucci L.L.* NMR of lignins. In *Lignin and Lignans: Advances in Chemistry* // CRC Press. 2010. P. 137–234.
30. *Zhang L., Gellerstedt G., Ralph J., Lu F.* NMR studies on the occurrence of spirodienone structures in lignins // *J. Wood Chem. Technol.* 2006. V.26. P.65–79.
31. *Ralph J., Catherine L., Boerjan W.* Lignin structure and its engineering // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 56. P. 240–249.
32. *Азаров В.И.* Химия древесины и синтетических полимеров [Текст] / В.И. Азаров, А.В. Буров, А.В. Оболенская. СПб.: АТА. 1999. – 312 с.
33. *Sjöström E.* *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications* // Gulf Professional Publishing. 1993. 293 p.
34. *Базарнова Н.Г.* Химия древесины и ее основных компонентов [Текст] / Н.Г. Базарнова. Барнаул: Изд-во АГУ. 2002. 50 с.
35. *Dixon R., Chen F., Guo D., Parvathi K.* The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid,” or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? // *Phytochemistry.* 2001. V. 57. № 7. P. 1069–1084.
36. *Humphreys J.M., Chapple C.* Rewriting the lignin roadmap. // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002. V. 5. № 3. P. 224–229.
37. *Davin L.B., Lewis N.G.* Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radial precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis // *Plant Physiol.* 2000. V. 123. № 2. P. 453–461.
38. *Rouhi A.M.* Only facts will end the lignin war // *Chem. Eng. News.* 2001. V. 79. № 14. P. 52–56.
39. *Sederoff R.R., MacKay J.J., Ralph J., Hatfield R.D.* Unexpected variation in lignin // *Curr. Opin. Plant Biol.* 1999. V. 2. № 2. P. 145–152.
40. *Cano-Delgado A., Penfield S., Smith C., Catley M., Bevan M.* Reduced cellulose synthesis invokes lignification and defense responses in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 2003. V. 34. № 3. P. 351–362.

41. *Boerjan W., Ralph J., Baucher M.* Lignin biosynthesis // *Annu Rev Plant Biol.* 2003. V. 54. P. 519–546.
42. *Nakashima J., Chen F., Jackson L., Shadle G., Dixon R.A.* Multi-site genetic modification of monolignol biosynthesis in alfalfa (*Medicago sativa*): effects on lignin composition in specific cell types // *New Phytol.* 2008. V. 179. № 3. P. 738–750.
43. *Shi C., Koch G., Ouzunova M., Wenzel G., Zein I.* Comparison of maize brown-midrib isogenic lines by cellular UV-microspectrophotometry and comparative transcript profiling // *Plant Mol. Biol.* 2006. V. 62. P. 697–714.
44. *Gierlinger N., Schwanninger M.* The potential of Raman microscopy and Raman imaging in plant research // *Spectroscopy.* 2007. V. 21. P. 69–89.
45. *Xu Z., Zhang D., Hu J., Zhou X., Ye X., Reichel K.L., Stewart N.R., Syrenne R.D.* Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom // *BMC Bioinformatics* 2009. V. 10. № 11. P. 1–15.
46. *Martone P.T., Estevez J.M., Lu F., Ruel K., Denny M.W., Somerville C., Ralph J.* Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 2. P. 169–175.
47. *Weng J.K., Akiyama T., Bonawitz N.D., Li X., Ralph J., Chapple C.* Convergent evolution of syringyl lignin biosynthesis via distinct pathways in the lycophyte *Selaginella* and flowering plants // *Plant Cell.* 2010. V. 22. № 4. P. 1033–1045.
48. *Novo E., Gomez L.V., Pomar F., Bernal M.A., Paradela A., Albar J.P., Ros Barcelo A.* The presence of sinapyl lignin in *Ginkgo biloba* cell cultures changes our views of the evolution of lignin biosynthesis // *Physiol. Plant.* 2009. V. 135. № 2. P. 196–213.
49. *Calvo-Flores F.* Lignin and Lignans as Renewable Raw Materials: Chemistry, Technology and Applications / F. Calvo-Flores [et al.]. – New York: John Wiley and Sons. 2015. 506 p.
50. *Jaakelainen A.S.* The effect of isolation method on the chemical structure of residual lignin // *Wood Sci. Technol.* 2003. V. 37. № 2. P. 91–102.
51. *Pepper J.M., Baylis P.E.T., Adler E.* The isolation and properties of lignins obtained by the acidolysis of spruce and aspen woods in dioxane-water medium // *Can. J. Chem.* 1959. V. 37. № 8. P. 1241–1248.

52. *Lupoi J.S., Singh S., Parthasarathi R., Simmons B.A., Henry R.J.* Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin // *Renew. Sustain. Energy Rev.* 2015. V. 49. P. 871–906.
53. *Карманов А.П.* Применение ИК-Фурье-спектроскопии для исследования лигнинов травянистых растений. // *Химия растительного сырья.* 2012. № 1. С.61–70.
54. *Ghaffar S.H., Fan M.* Structural analysis for lignin characteristics in biomass straw // *Biomass and Bioenergy.* 2013. Vol. 57. P. 264–279.
55. *Roeges N.P.G.* A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures // Chichester: Wiley. 1994. 340 p.
56. *Goldmann W. M., Ahola J., Mankinen O., Kantola A. M., Komulainen S.* Determination of Phenolic Hydroxyl Groups in Technical Lignins by Ionization Difference Ultraviolet Spectrophotometry ( $\Delta\epsilon$ -IDUS method) // *Period. Polytech. Chem. Eng.* 2016. V. 61. № 2. P. 93–101.
57. *Jablonsky M., Kočiš, Ház and Šima J.* Characterization and comparison by UV spectroscopy of precipitated lignins and commercial lignosulfonates // *Cellulose chem. Technol.* 2015. V. 49. P. 267-274.
58. *Gärtner A., Gellerstedt G., Tamminen T.* Determination of phenolic hydroxyl groups in residual lignin using a modified UV-method // *Nordic Pulp and Paper Research Journal.* 2018. V. 14. № 2. P.163–170.
59. *Balakshin M.* On the Quantification of Lignin Hydroxyl Groups with  $^{31}\text{P}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy // *J. of Wood Chem and Technol.* 2015. V. 35. P. 220–237.
60. *Wen J.* Recent Advances in Characterization of Lignin Polymer by Solution-State Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Methodology // *Materials.* 2013. V. 6. № 1. P. 359–391.
61. *Zhang L.M., Gellerstedt G.* Quantitative 2D HSQC NMR determination of polymer structures by selecting suitable internal standard references // *Magn. Reson. Chem.* 2007. V. 45. P. 37–45.
62. *Balakshin M., Capanema E., Gracz H., Chang H., Jameel H.* Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy // *Planta.* 2011. V. 233. P. 1097–1110.

63. *Ralph J., Lapierre C., Lu F. C.* NMR evidence for benzodioxane structures resulting from incorporation of 5-hydroxyconiferyl alcohol into lignins of O-methyltransferase deficient poplars // *J. Agric. Food Chem.* 2001. V. 49. № 7. P. 86–91.
64. *Capanema E.A., Balakshin M.Y., Kadla J.F.* A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52. P. 1850–1860.
65. *Wen J.-L., Xue B.-L., Xu F., Sun R.-C., Pinkert A.* Unmasking the structural features and property of lignin from bamboo. // *Ind. Crop. Prod.* 2013. V. 42. P. 332–343.
66. *Карманов А.П., Кочева Л.С., Белый В.А., Миронов М.В., Беляев В.Ю., Монаков Ю.Б.* Лигнин из соломы: гидродинамические и конформационные свойства макромолекул // *Журнал прикладной химии.* 2008. Т. 81. № 11. С. 1918–1924.
67. *Ralph J., Gutiérrez A., del Río J.C., Rencoret J.* Structural Characterization of Wheat Straw Lignin as Revealed by Analytical Pyrolysis, 2D-NMR, and Reductive Cleavage Methods // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 23. P. 5922–5935.
68. *Beliy V.A., Pechnikova A.A., Kocheva L.S., Moskalev A.A., Karmanov A.P.* Lignins of *Rhodiola rosea* and *Serratula coronata*: peculiarities of chemical structure and antioxidant properties. // *Adv. gerontol.* 2010. V.23. № 2. P. 221–227
69. *Martínez A.T., Rencoret J., Marques G., Gutierrez A., Ibarra D., Jimenez-Barbero J., del Río J.C.* Monolignol acylation and lignin structure in some nonwoody plants: a 2D NMR study. // *Phytochemistry.* 2008. V. 69. № 69. P. 2831–2843.
70. *Lan W., Lu F., Regner M., Zhu Y., Rencoret J., Ralph S.A., Zakai U.I., Morreel K., Boerjan W., Ralph J.* Tricin, a flavonoid monomer in monocot lignification. // *Plant Physiol.* 2015. V. 167. P. 1284–1295
71. *Del Río J.C., Rencoret J., Gutierrez A., Nieto L., Jimenez-Barbero J., Martinez A.T.* Structural Characterization of Guaiacyl-Rich Lignins in Flax (*Linum Usitatissimum*) Fibers and Shives. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59, № 20. P. 11088–11099.
72. *Buranov A.U., Mazza G.* Lignin in straw of herbaceous crops. // *Ind. Crops Prod.* 2008. V. 28. №3. P. 237–259.

73. *Sun R., Lawther J.M., Banks W.B.* A tentative chemical structure of wheat straw lignin // *Ind. Crops Prod.* 1997. V. 6. № 1. P. 1–8.
74. *Lam T.B., Kadoya K., Iiyama K.* Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and p-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the beta-position, in grass cell walls // *Phytochemistry.* 2001. V. 57, № 6. P. 987–992.
75. *Mottiar Y., Vanholme R., Boerjan W., Ralph J., Mansfield S.D.* Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2016. V. 37. P. 190–200.
76. *Rinaldi R., Jastrzebski R., Clough M.T.* Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis // *Angew. Chem. Int. Edit.* 2016. V. 55. № 29. P. 8164–8215.
77. *Baumberger S., Abaecherli A., Fasching M.* Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: towards standardisation of the method // *Holzforschung.* 2007. V. 61. № 4. P. 459–468.
78. *Tolbert A., Akinosho H., Khunsupat R., Naskar A.K., Ragauskas A.J.* Characterization and analysis of the molecular weight of lignin for biorefining studies // *Biofuel Bioprod. Bioref.* 2014. V. 8. № 6. P. 836–856.
79. *Brunow G.* *Methods to Reveal the Structure of Lignin* // New York: John Wiley & Sons. 2005. P. 89–99.
80. *Asikkala J.* Accurate and Reproducible Determination of Lignin Molar Mass by Acetobromination // *J. Agric. Food Chem.* 2012. V. 60. № 36. P. 8968–8973.
81. *Constant S., Wienk H.J., Frissen A.E., Peinder P., Boelens R., van Es D.S., Grisel R.H., Weckhuysen B.M., Huijgen W.J., Gosselink R.A., Bruijnincx P.A.* New insights into the structure and composition of technical lignins: A comparative characterisation study // *Green Chem.* 2016. V. 18. P. 2651–2665.
82. *Kalliola A., Asikainen M., Talja R., Tamminen T.* Experiences of kraft lignin functionalization by enzymatic and chemical oxidation // *Bioresources.* 2014. V. 9. № 4. P. 7336–7351.
83. *Hu Z., Du X., Liu J., Chang H., Jameel H.* Structural characterization of pine kraft lignin: BioChoice lignin vs indulin AT // *J. Wood Chem. Technol.* 2016. V. 36. P. 432–446.

84. *Fang Z.* Production of Biofuels and Chemicals from Lignin // Munich: Springer. 2016. 434 p.
85. *Guillén M.D., Ibargoitia M.L.* GC/MS analysis of lignin monomers, dimers and trimers in liquid smoke flavourings // *J. Sci Food Agric.* 1999. V.79. № 13. P. 1889–1903.
86. *Hedges J.I., Ertel J.R.* Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products // *Anal Chem.* 1982. V.54. № 2. P. 174–178.
87. *Hemández M.* Analysis of alkali-lignin in a paper mill effluent decolourised with two *Streptomyces* strains by gas chromatography-mass spectrometry after cupric oxide degradation // *J. Chromatogr. A.* 2001. V. 919. № 2. P. 389–394.
88. *Lapierre C., Monties B., Rolando C., Chirale L.* Thioacidolysis of lignin: Comparison with acidolysis // *J. Wood Chem Technol.* 1985. V. 5. № 2. P. 277–292.
89. *Önnerud H.* Lignin structures in normal and compression wood. Evaluation by thioacidolysis using ethanethiol and methanethiol // *Holzforschung.* 2003. V. 57. № 4. P. 377–384.
90. *Christiernin M., Ohlsson A.B., Berglund T., Henriksson G.* Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall // *Plant Physiol Biochem.* 2005. V. 43. № 8. P. 777–785.
91. *Chen F., Zhuo C., Xiao X., Pendergast T.H., Devos K.M.* A rapid thioacidolysis method for biomass lignin composition and triclin analysis // *Biotechnol Biofuels.* 2021. V. 14. № 1. P.14-18.
92. *Lu F., Ralph J.* DFRC method for lignin analysis. 1. New method for  $\beta$ -aryl ether cleavage: Lignin model studies // *J. Agric Food Chem.* 1997. V.45. № 12. P. 4655–4660.
93. *Lu F., Ralph J.* The DFRC method for lignin analysis. 2. Monomers from isolated lignins // *J. Agric Food Chem.* 1998. V. 46. № 2. P. 547–552.
94. *Bunzel M., Seiler A., Steinhart H.* Characterization of dietary fiber lignins from fruits and vegetables using the DFRC method // *J. Agric Food Chem.* 2005. V. 53. № 24. P. 9553–9559.

95. *Meier D., Faix O.* Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. In *Methods in Lignin Chemistry* // Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg. 1992. P. 177–199.
96. *Van de Hage E., Mulder M.M., Boon J.J.* Structural characterization of lignin polymers by temperature resolved in-source pyrolysis mass spectrometry and Curie-point pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 1993. V. 25. P. 149–183.
97. *Challinor J. M.* A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 1989. V.16. P. 323–333.
98. *Martin F., del Rio J. C., Gonzalez-Vila F.J., Verdejo T.* Thermally assisted hydrolysis and alkylation of lignins in the presence of tetra-alkylammonium hydroxides // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 1995. V. 35. № 1. P. 1–13.
99. *Hatcher P.G., Minard R.D.* Comparison of dehydrogenase polymer (DHP) lignin with native lignin from gymnosperm wood by thermochemolysis using tetramethylammonium hydroxide (TMAH) // *Org. Geochem*. 1996. V. 24. № 6. P. 593–600.
100. *Kuroda K., Nishimura N., Izumi A., Dimmel D.* Pyrolysis of Lignin in the Presence of Tetramethylammonium Hydroxide: A Convenient Method for S/G Ratio Determination. // *J. Agric. Food Chem*. 2002. V. 50. № 5. P. 1022–1027.
101. *Naron D.R, Collard F-X., Tyhoda L., Görgens J.F.* Characterisation of lignins from different sources by appropriate analytical methods: Introducing thermogravimetric analysis-thermal desorption-gas chromatography–mass spectroscopy // *Ind. Crops. Prod*. 2017. V. 101. P. 61–74.
102. *Chen F., Yao J., Lin Y., Gu M., Li S.* Thermogravimetric mass spectrometry of lignin pyrolysis under the co-action of CaO and  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  // *BioResources*. 2020. V. 15. № 2. P. 3356–3367.
103. *Zhou Z., Liu C., Chen X., Ma H., Zhou C., Wang Y., Qi F.* On-line photoionization mass spectrometric study of lignin and lignite co-pyrolysis: Insight into the synergetic effect. // *J. Anal Appl Pyrolysis*. 2019. V. 137. P. 285–292.
104. *Ribechini E., Mangani F., Colombini M.P.* Chemical investigation of barks from broad-leaved tree species using EGA-MS and GC/MS // *J. Anal Appl Pyrolysis*. 2015. V. 114. P.235–242.

105. *Xu L., Ma X., Murria P., Talpade A., Sheng H., Meilan R., Chapple C., Agrawal R., Delgass N., Ribeiro F.H., Kenttämä H.I.* Fast Determination of the Lignin Monomer Compositions of Genetic Variants of Poplar via Fast Pyrolysis/Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2021. V. 32. № 10. P. 2546–2551.
106. *Dier T.K.F., Rauber D., Jauch J., Hempelmann R., Volmer D.A.* Novel mixed-mode stationary phases for chromatographic separation of complex mixtures of decomposed lignin // *ChemistrySelect.* 2017. V. 2. № 2. P. 779–786.
107. *Mokochinski J.B., Bataglion G.A., Kiyota E., De Souza L.M., Mazzafera P., Sawaya A.C.* A simple protocol to determine lignin S/G ratio in plants by UHPLC-MS // *Anal Bioanal Chem.* 2015. V. 407. № 23. P. 7221–7227.
108. *Zheng M., Gu S., Chen J., Luo Y., Li W., Ni J., Li Y., Wang Z.* Development and validation of a sensitive UPLC–MS/MS instrumentation and alkaline nitrobenzene oxidation method for the determination of lignin monomers in wheat straw // *J. Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017. V. 1055. P. 178–184.
109. *Prothmann J., Sun M., Spégel P., Sandahl M., Turner C.* Ultra-highperformance supercritical fluid chromatography with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UHPSFC/QTOF-MS) for analysis of lignin-derived monomeric compounds in processed lignin samples // *Anal Bioanal Chem.* 2017. V. 409. № 30. P. 7049–7061.
110. *Dubuis A., Le Masle A., Chahen L., Destandau E., Charon N.* Centrifugal partition chromatography as a fractionation tool for the analysis of lignocellulosic biomass products by liquid chromatography coupled to mass spectrometry // *J. Chrom A.* 2019. V. 1597. P. 159–166.
111. *Kiyota E., Mazzafera P., Sawaya A.C.* Analysis of soluble lignin in sugarcane by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a do-it-yourself oligomer database // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 16. P. 7015–7020.
112. *Amundson L.M., Eismann R.J., Reece J.N., Fu M., Habicht S.C., Mossman A.B., Shea R.C., Kenttämä H.I.* Identification and counting of oxygen functionalities in aromatic analytes related to lignin by using negative-mode electrospray ionization and multiple collision-activated dissociation steps // *Energy Fuels.* 2011. V. 25. № 7. P. 3212–3222.

113. *Marcum C.L., Jarrell T.M., Zhu H., Owen B.C., Hauptert L.J., Easton M., Hosseinaei O., Bozell J., Nash J.J., Kenttämä H.I.* A fundamental tandem mass spectrometry study of the collision-activated dissociation of small deprotonated molecules related to lignin // *ChemSusChem*. 2016. V. 9. № 24. P. 3513–3526.
114. *Metzger J.O., Bicke C., Faix O., Tuszynski W., Angermann R., Karas M., Strupat K.* Matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of lignins // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1992. V. 31. № 6. P. 762–764.
115. *Richel A., Vanderghem C., Simon M., Wathelet B., Paquot M.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for second-generation lignin analysis // *Anal. Chem. Insights*. 2012. V. 7. P. 79–89.
116. *Araújo P., Ferreira M.S., de Oliveira D.N., Pereira L., Sawaya A.C., Catharino R.R., Mazzafera P.* Mass spectrometry imaging: An expeditious and powerful technique for fast in situ lignin assessment in Eucalyptus // *Anal Chem*. 2014. V. 86. № 7. P. 3415–3419.
117. *Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., Sorokina E.A., Gorbova N.S.* Optimization of sample preparation conditions in the study of lignin by MALDI mass spectrometry. // *J. Anal. Chem*. 2014. V. 69. № 14. P. 1344–1350.
118. *Kosyakov D.S., Anikeenko E.A., Ul'yanovskii N.V., Khoroshev O.Y., Shavrina I.S., Gorbova N.S.* Ionic liquid matrices for MALDI mass spectrometry of lignin. // *Anal Bioanal Chem*. 2018. V. 410. № 28. P. 7429–7439.
119. *Qi Y.L., Volmer D.A.* Chemical diversity of lignin degradation products revealed by matrix-optimized MALDI mass spectrometry // *Anal Bioanal Chem*. 2019. V. 411. № 23. P. 6031–6037.
120. *Banoub J., Delmas G.H., Joly N., Mackenzie G., Cachet N., Benjelloun-Mlayah B., Delmas M.* A critique on the structural analysis of lignins and application of novel tandem mass spectrometric strategies to determine lignin sequencing // *J. Mass Spectrom*. 2015. V. 50. № 1. P. 5–48.
121. *Tasahil A., Abanoub M., Fereidoon S., Travis D., Delmas M., Banoub J.* Top-down ligninomic matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight tandem mass spectrometry analysis of lignin oligomers extracted from date palm wood // *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2019. V. 33. № 6. P. 539–560.

122. *Yoshioka K., Ando D., Watanabe T.* A comparative study of matrix- and nano-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of isolated and synthetic lignin // *Phytochem. Anal.* 2012. V. 23. №. 3. P. 248–253.
123. *Qi Y., Hempelmann R., Volmer D.A.* Characterization of Lignin Compounds at the Molecular Level: Mass Spectrometry Analysis and Raw Data Processing // *Anal. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 28. P. 8203–8210.
124. *Owen B.C., Hauptert L.J., Jarrell T.M., et al.* High-performance liquid chromatography/high-resolution multiple stage tandem mass spectrometry using negative-ion-mode hydroxide-doped electrospray ionization for the characterization of lignin degradation products // *Anal. Chem.* 2012. V. 84. № 14. P. 6000–6007.
125. *Letourneau D.R., Volmer D.A.* Mass spectrometry-based methods for the advanced characterization and structural analysis of lignin: A review // *Mass Spec Rev.* 2021. P. 1–45.
126. *Лебедев А.Т.* Масс-спектрометрия в органической химии [Текст] / А.Е. Лебедев. Издание второе, переработанное. М.: Техносфера. 2015. 704 с.
127. *Rose R., Damoc E., Denisov E., Makarov A., Heck A.* High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies // *Nat. Methods.* 2012. V 9. P. 1084–1086.
128. *Zubarev R.A., Makarov A.* Orbitrap Mass Spectrometry // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 5288–5296.
129. *Krutchinsky A. N., Chait B.T.* On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002. V. 13. № 2. P. 129–134.
130. *Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., Anikeenko E.A., Gorbova N.S.* Negative ion mode atmospheric pressure ionization methods in lignin mass spectrometry: a comparative study // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2016. V. 30. P. 2099–2108.
131. *Kubatova A., Andrianova A.A., Hatton J., Kozliak E.I.* Atmospheric pressure ionization mass spectrometry as a tool for structural characterization of lignin // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2020. V. 34. e8813.
132. *Morreel K., Dima O., Kim H.* Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers // *Plant Physiol.* 2010. V. 153. № 4. P. 1464–1478.
133. *Yulin Qi, Pingqing F., Siliang Li, Chao Ma, Congqiang L., Volmer D.R.* Assessment of molecular diversity of lignin products by various ionization techniques and high-

- resolution mass spectrometry // *Science of the Total Environment*. 2020. V. 713. P.136573.
134. *Jarrell T.M., Marcum C.L., Sheng H., Owen B.C., O'Lenick C.J., Maraun H., Kenttämää H.I.* Characterization of organosolv switchgrass lignin by using high performance liquid chromatography/high resolution tandem mass spectrometry using hydroxide-doped negative-ion mode electrospray ionization // *Green Chem.* 2014. V. 16. № 5. P. 2713–2727.
135. *Krutov S.M., Evtuguin D.V., Ipatova E.V., Santos A.O., Sazanov Y.N.* Modification of acid hydrolysis lignin for value-added applications by micronization followed by hydrothermal alkaline treatment // *Holzforschung*. 2015. V. 69. №. 6. P. 761–768.
136. *Crawford E.A., Gerbig S., Spengler B., Volmer D.A.* Rapid fingerprinting of lignin by ambient ionization high resolution mass spectrometry and simplified data mining // *Anal Chim. Acta*. 2017. V. 994. P. 38–48.
137. *Banoub J.H., Benjelloun-Mlayah B., Ziarelli F., Joly N., Delmas M.* Elucidation of the complex molecular structure of wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure photoionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. V. 21. №. 17. P. 2867–2888.
138. *D'Auria M., Emanuele L., Racioppi R.* FT-ICR-MS analysis of lignin // *Nat Prod Res.* 2012. V. 26. №. 15. P. 1368–1374.
139. *Prothmann J., Spégel P., Sandahl M., Turne C.* Identification of lignin oligomers in Kraft lignin using ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution multiple-stage tandem mass spectrometry (UHPLC/HRMS<sub>n</sub>) // *Anal Bioanal Chem.* 2018. V. 410. P.7803–7814.
140. *Reymond C., Dubuis A., Masle A. L., Colas C., Chahen L., Destandau E., Charon N.* Characterization of liquid-liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry // *J. of Chrom A*. 2019. P. 460569.
141. *Banoub J. H., Delmas M.* Structural elucidation of the wheat straw lignin polymer by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2003. V. 38. № 8. P. 900–903.

142. *Evtuguin D.V., Domingues P., Amado F.L., Pascoal N., Correia A.J.* Electrospray Ionization Mass Spectrometry as a Tool for Lignins Molecular Weight and Structural Characterisation // *Holzforschung*. 1999. V. 53. № 5. P. 525–528.
143. *Munisamy S.M., Chambliss C.K., Becker C.* Direct infusion electrospray ionization mobility high resolution mass spectrometry (DIESI-IM-HRMS) for rapid characterization of potential bioprocess streams // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2012. V. 23. № 7. P. 1250–1259.
144. *Reale S., Di Tullio A., Spreti N., De Angelis F.* Mass spectrometry in the biosynthetic and structural investigation of lignins // *Mass Spectrom. Rev.* 2004. V. 23. № 2. P. 87–126.
145. *Hauptert L.J., Owen B.C., Marcum C.L., et al.* Characterization of model compounds of processed lignin and the lignome by using atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry // *Fuel*. 2012. V. 95. P. 634–641.
146. *Andrianova A., Di Prospero T., Geib C., Smoliakova I., Kozliak E., Kubatova A.* Electrospray ionization with high-resolution mass spectrometry as a tool for lignomics: Lignin mass spectrum deconvolution. // *J. Am Soc. Mass Spectrom.* 2018. V. 29. № 5. P. 1044–1059.
147. *Konermann L., Ahadi E., Rodriguez A.D., Vahidi S.* Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 1. P. 2–9.
148. *Shardrack O.A., Fan H., Bert C.L.* Characterization and sequencing of lithium cationized b-O-4 lignin oligomers using higher-energy collisional dissociation mass spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. 2019. V. 1047. P. 104–114.
149. *Meija J.* Mathematical tools in analytical mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 385. P. 486–499.
150. *Kind T., Fiehn O.* Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry // *BMC Bioinformatics*. 2007. V.8. №.105. P.1–20.
151. *Van Krevelen D.* Graphical statistical method for the study of structure and reaction processes of coal // *Fuel*. 1950. V. 29. P. 228–269.
152. *Kim S., Kramer R.W., Hatcher P.G.* Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the Van Krevelen diagram // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. № 20. P. 5336–5344.

153. Gougeon R.D., Lucio M., Frommberger M., Peyron D., Chassagne D., Alexandre H., et al. The chemodiversity of wines can reveal a metabo-geography expression of cooperage oak wood. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 23. P. 9174–9179.
154. Echavarri-Bravo V., Tinzl M., Kew W., Cruickshank F., Logan Mackay C., Clarke D.J., Horsfall L.E. High resolution fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS) for the characterisation of enzymatic processing of commercial lignin // New Biotechnol. 2019. V. 52. P. 1–8.
155. Kew W., Blackburn J.W.T., Clarke D.J., Uhrin D. Interactive van Krevelen diagrams—Advanced visualisation of mass spectrometry data of complex mixtures // Rapid Commun Mass Spectrom. 2017. V. 31. № 7. P. 658–662.
156. Mikhnevich T. A., Vyatkina A. V., Grigorenko V. G., Rubtsova M. Yu., Rukhovich G. D., Letarova M. A., Kravtsova D. S., Vladimirov S.A., Orlov A.A., Nikolaev E.N., Zhrebker A., Perminova I. V. Inhibition of Class A  $\beta$ -Lactamase (TEM-1) by Narrow Fractions of Humic Substances // ACS Omega. 2021. V. 6. № 37. P. 23873–23883.
157. Perminova I.V., Shirshin E.A., Zhrebker A., Pipko I.I., Pugach S.P., Dudarev O.V., Semiletov I.P. Signatures of Molecular Unification and Progressive Oxidation Unfold in Dissolved Organic Matter of the Ob-Irtysh River System along Its Path to the Arctic Ocean // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 1. 19487.
158. Perminova I.V., Dubinenkov I.V., Kononikhin A.S., Konstantinov A.I., Zhrebker A.Y., Andzhushev M.A., Nikolaev E.N. Molecular Mapping of Sorbent Selectivities with Respect to Isolation of Arctic Dissolved Organic Matter as Measured by Fourier Transform Mass Spectrometry // Environmental Science & Technology. 2014. V. 48. № 13. P. 7461–7468.
159. Zhrebker A., Rukhovich G., Kharybin O., Fedoros E.I., Perminova I.V., Nikolaev E.N. FTICR-MS for the analysis of molecular composition and batch-to-batch consistency of plant derived polyphenolic ligand developed for biomedical application // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2020. V.34. № 18. e8850.
160. Zhigang Wu., Rodgers P.R., Marshall A.G. Two- and Three-Dimensional van Krevelen Diagrams: A Graphical Analysis Complementary to the Kendrick Mass

- Plot for Sorting Elemental Compositions of Complex Organic Mixtures Based on Ultrahigh-Resolution Broadband Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Measurements // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 9. P. 2511–2516.
161. *Hughey C.A., Hendrickson C.L., Rodgers R.P., Marshall A.G., Qian K.* Kendrick mass defect spectrum: a compact visual analysis for ultrahigh-resolution broadband mass spectra // *Anal. Chem.* 2001. V. 73. № 19. P. 4676–4681.
162. *Cho Y., Ahmed A., Islam A., Kim S.* Developments in FT-ICR MS instrumentation, ionization techniques, and data interpretation methods for petroleomics // *Mass Spectrom. Rev.* 2015. V. 34. № 2. P. 248–263.
163. *Sleighter R.L., Hatcher P.G.* The application of electrospray ionization coupled to ultrahigh resolution mass spectrometry for the molecular characterization of natural organic matter // *J. Mass Spectrom.* 2007. V.42. № 5. P. 559–574.
164. *Zheng Q.X., Morimoto M., Sato H., Takanoashi T.* Molecular composition of extracts obtained by hydrothermal extraction of brown coal // *Fuel.* 2015. V. 159. P. 751–758.
165. *Marshall A.G., Rodgers R.P.* Petroleomics: The next grand challenge for chemical analysis // *Acc. Chem. Res.* 2004. V. 37. № 1. P. 53–59.
166. *Poyer S., Fouquet T., Sato H., Lutz J.F., Charles L.* Convenient Graphical Visualization of Messages Encoded in Sequence-Defined Synthetic Polymers Using Kendrick Mass Defect Analysis of their MS/MS Data // *Macromolecular Chemistry and Physics.* 2018. V. 219. № 16. P. 1–9.
167. *Nakamura S., Fouquet T., Sato H.* Molecular Characterization of High Molecular Weight Polyesters by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization High-Resolution Time-of-Flight Mass Spectrometry Combined with On-plate Alkaline Degradation and Mass Defect Analysis // *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.* 2019. V. 30. №. 2. P. 355–367.
168. *Fouquet T., Sato H.* Extension of the Kendrick Mass Defect Analysis of Homopolymers to Low Resolution and High Mass Range Mass Spectra Using Fractional Base Units // *Analytical Chemistry.* 2017. V. 89. №. 5. P. 2682–2686.
169. *Yulin Q., Hempelmann R., Volmer D.* Shedding light on the structures of lignin compounds: photo-oxidation under artificial UV light and characterization by high

- resolution mass spectrometry // *Anal Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 28. P. 8203–8210.
170. *Dier T., Egele K., Fossog V., Hempelmann R., Volmer D.* Enhanced Mass Defect Filtering To Simplify and Classify Complex Mixtures of Lignin Degradation Products // *Anal Chem.* 2016. V. 88. № 2. P. 1328–1335.
171. *Qi Y., Hempelmann R., Volmer D.* Two-dimensional mass defect matrix plots for mapping genealogical links in mixtures of lignin depolymerisation products // *Anal Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 18. P. 4835–4843.
172. *Tobias K., Dier F., Fleckenstein M., Militz H., Volmer D.A.* Exploring the potential of high resolution mass spectrometry for the investigation of lignin-derived phenol substitutes in phenolic resin syntheses // *Anal Bioanal Chem.* 2017. V. 409. P. 3441–3451.
173. *Prothmann J, Li K, Hulteberg C, Spégel P, Sandahl M, Turner C.* Nontargeted analysis strategy for the identification of phenolic compounds in complex technical lignin samples // *ChemSusChem.* 2020. V. 13. № 17. P. 4605–4612.
174. *Brereton R.G.* Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant // John Wiley & Sons, Chichester. 2003. V. 489. P. 161.
175. *Falev D.I., Kosyakov D.S., Ul'yanovskii N.V., Ovchinnikov D.V., Shestakov S. L.* Subcritical extraction of birch bark pentacyclic triterpenes // *Russian Chemical Bulletin.* 2017. V. 66. № 5. P. 875—881.
176. *Asteggiano A., Franceschi P., Zorzi M., Aigotti R., Dal Bello F., Baldassarre F., Lops F., Carlucci A., Medana C., Ciccarella G.* HPLC-HRMS Global Metabolomics Approach for the Diagnosis of “Olive Quick Decline Syndrome” Markers in Olive Trees Leaves // *Metabolites.* 2021. V. 11. № 1 P. 40-57.
177. *Mangraviti D., Rigano F., Arig`o A., Dugo P., Mondello L.* Differentiation of Italian extra virgin olive oils by rapid evaporative ionization mass spectrometry // *LWT - Food Science and Technology.* 2021. 110715.
178. *Reyes-Riveraa J., Solanoa E., Terrazas T., Soto-Hernández M., Arias S., Almanza-Arjona Y., Polindara-García L.* Classification of lignocellulosic matrix of spines in Cactaceae by Py-GC/MS combined with omic tools and multivariate analysis: A chemotaxonomic approach // *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 2020. V. 148. 104796.

179. *Boeriu C.G., Bravo D., Gosselink R.J.A., van Dam J.E.G.* Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy // *Ind. Crops Prod.* 2004. V. 20. № 2. P. 205–218.
180. *Revelskii I.A., Yashin Y.S., Revel'skii A.I.* Atmospheric Pressure Photoionization Mass Spectrometry: New Capabilities for the Determination of the Numbers of Components in Complex Mixtures and Their Identification. // *J. of Anal Chem.* V. 74. № 2. P. 192–197.
181. *Revelskii I.A., Yashin Y.S., Kurochkin V.K., Kostyanovskii R.G.* Mass-spectrometry with photoionization at atmospheric-pressure and the analysis of multicomponent mixtures without separation // *Industrial Laboratory.* V. 57. № 3. P. 243–248.
182. *Kosyakov D.S., Ipatova E.V., Krutov S.M., Ul'yanovskii N.V., Pikovskoi I.I.* Study of Products of the Alkaline Decomposition of Hydrolysis Lignin by Atmospheric Pressure Photoionization High-Resolution Mass Spectrometry. // *Journal of Analytical Chemistry.* 2017. V. 72. № 14. P. 1396–1403.
183. *Ivakhnov A.D., Shavrina I.S., Kosyakov D.S., Pikovskoi I.I., Dumanskii I.O.* Depolymerization of Alkaline Lignin in the Medium of Supercritical 2-Propanol // *Russian Journal of Applied Chemistry.* 2020. V. 93. № 1. P. 99–107.
184. *Zakis G.F.* Synthesis of Lignin Model Compounds // *Zinatne, Riga.* 1980. 288 p.
185. *Ralph J., Hatfield R.D., Quideau S.* Pathway of p-Coumaric Acid Incorporation into Maize Lignin As Revealed by NMR // *J. Am. Chem. Soc.* 1994. V. 116. № 21. P. 9448–9456.
186. *Pew J.C.* Nitrobenzene Oxidation of Lignin Model Compounds, Spruce Wood and Spruce “Native Lignin” // *J. Am. Chem. Soc.* 1955. V. 77. №10. P. 2831–2833.
187. *Turnipseed S.B., Andersen W.C., Karbiwnyk C.M., Roybal J.E., Miller K.E.* Nodischarge atmospheric pressure chemical ionization: evaluation and application to the analysis of animal drug residues in complex matrices // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. V. 20. P. 1231–1239.
188. *Syage J.A.* Mechanism of  $[M+H]^+$  formation in photoionization mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. V. 15. P. 1521–1533.
189. *Kaupilla T.J., Syage J.A., Benter T.* Recent developments in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry // *Mass Spectrom. Rev.* 2017. V.36. P.423–449.

190. *Marchi I., Rudaz S., Veuthey J.-L.* Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review // *Talanta*. 2009. V. 78. P. 1–18.
191. *Kuznetsova M.V., Kosyakov D.S., Gorbova N.S., Bogolitsyn K.G.* Acidity constants of lignin model compounds in the electronically excited state in water N,N-dimethylformamide mixtures // *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2020. V. 94. P. 1587–1595.
192. *Kauppila T.J., Kotiaho T., Kostianen R., Bruins A.P.* Negative ion atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. V. 15. P. 203–210.
193. *Kauppila T.J., Kersten H., Benter T.* Ionization of EPA contaminants in direct and dopant-assisted atmospheric pressure photoionization and atmospheric pressure laser ionization // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2015. V. 26. P. 1036–1045.
194. *Robb D.B., Blades M.W.* Effects of solvent flow, dopant flow, and lamp current on dopant-assisted atmospheric pressure photoionization (DA-APPI) for LCMS. Ionization via proton transfer // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005. V. 16. P. 1275–1290.
195. *Kauppila T.J., Bruins A.P.* Effect of the solvent flow rate on the ionization efficiency in atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005. V. 16. P. 1399–1407.
196. *Marques A. V., Pereira H.* Lignin monomeric composition of corks from the barks of *Betula pendula*, *Quercus suber* and *Quercus cerris* determined by Py-GC-MS/FID // *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 2013. V. 100. P. 88–94.
197. *Koch B.P., Dittmar T. M., Kattner G.* Fundamentals of molecular formula assignment to ultrahigh resolution mass data of natural organic matter // *Anal Chem.* 2007. V. 79. P. 1758–1763.
198. *Kendrick E.* A mass scale based on  $\text{CH}_2 = 14.0000$  for high resolution mass spectrometry of organic compounds // *Anal Chem.* 1963. V. 35. № 13. P. 2146–2154.
199. *Capanema E.A., Balakshin M.Y., Chen C.L., Gratzl J.S., Gracz H.* Structural analysis of residual and technical lignins by H-1-C-13 correlation 2D NMR-spectroscopy // *Holzforschung*. 2001. V. 55. № 3. P. 302–308.