

На правах рукописи



Жеребкер Александр Яковлевич

**ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ ГУМИНОВЫХ ВЕЩЕСТВ
МЕТОДАМИ ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА И
МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

Специальность 02.00.03 – органическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2017

Работа выполнена на кафедре медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Перминова Ирина Васильевна

доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Бродский Ефим Соломонович

доктор химических наук, старший научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией аналитической экотоксикологии ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук

Офицеров Евгений Николаевич

доктор химических наук, профессор, декан факультета химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится «16» июня 2017 г. в 11 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.97 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория 446.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте Химического факультета <http://www.chem.msu.ru>

Автореферат диссертации размещен на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: <http://vak.ed.gov.ru>

Автореферат разослан «27» апреля 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.97,
кандидат химических наук



Синикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Гуминовые вещества (ГВ) образуются в результате стохастического синтеза из продуктов трансформации биомакромолекул, входящих в состав отмирающей биомассы. Как следствие, они представляют собой супрамолекулярные системы природных органических соединений с высокой степенью структурной гетерогенности, определяющей их устойчивость к биоразложению. Гумификация является вторым по масштабности процессом после фотосинтеза. ГВ составляют от 30 до 80% органического вещества вод, почв и горючих ископаемых. Одной из важных функций ГВ в биосфере является защитная, обусловленная их мощными стресс-протекторными и антивирусными свойствами. В то же время применение данных свойств ГВ на практике весьма ограничено, так как отсутствуют подходы к установлению структуры наиболее активных компонентов ГВ. Для идентификации отдельных молекул в системах такой сложности необходимо применение метода, обладающего сверхвысоким разрешением. Поэтому масс-спектрометрия ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МС ИЦР ПФ) стала незаменимым методом исследования молекулярной организации гуминовых веществ. Общепринятым подходом к извлечению структурной информации из данных МС ИЦР ПФ гуминовых веществ является построение диаграмм Ван Кревелена, представляющих собой двумерную проекцию композиционного состава вещества в координатах атомных соотношений Н/С и О/С, и их последующего разбиения на области, которые соответствуют химическим классам основных прекурсоров ГВ: лигнинам, таннинам, терпеноидам, пептидам, углеводам и т.п.. Это позволяет сравнивать молекулярный состав ГВ из различных природных источников. Однако существенным недостатком такого подхода является косвенный характер получаемой информации о структуре молекулярных компонентов, входящих в состав ГВ. Для надежной идентификации индивидуальных молекул широко применяется метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС). Однако из-за экстремальной структурной гетерогенности гуминовых веществ задача выделения целевого пика для последующей фрагментации и регистрации осколков требует колоссальных затрат приборного времени и была реализована только в единичном исследовании низкомолекулярного образца растворенного органического вещества.

Альтернативным способом извлечения структурной информации из данных МС ИЦР ПФ может служить введение изотопных меток в состав индивидуальных компонентов ГВ. Например, в литературе описан способ газофазного дейтериеводородного обмена подвижных протонов в источнике ионизации масс-спектрометра, который позволяет по длине серий Н/D обмена определить количество подвижных протонов в каждой молекуле ГВ. Однако описанный подход не несет информации об углеродном скелете молекул. Для получения такой информации необходимо применение методов селективного Н/D обмена скелетных протонов и направленной модификации функциональных групп.

Целью данной работы является определение структурных фрагментов индивидуальных компонентов в составе гуминовых веществ методами селективного

изотопного обмена и масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Исследовать широкую выборку ГВ, выделенных из различных источников, методом МС ИЦР ПФ для установления закономерностей изменения молекулярного состава;
- 2) Синтезировать структурные аналоги ароматического каркаса ГВ путем окислительной поликонденсации лигнинных и фенольных прекурсоров;
- 3) Разработать методическое обеспечение для селективного введения дейтериевых меток в углеродный скелет ГВ и способы интерпретации данных МС ИЦР ПФ изотопного обмена;
- 4) Изучить влияние реакций обратного обмена в источнике ионизации масс-спектрометра и процедуры пробоподготовки на результаты анализа меченых образцов ГВ методом МС ИЦР ПФ;
- 5) Применить метод селективного изотопного обмена и МС ИЦР ПФ для определения структурных фрагментов индивидуальных компонентов ГВ;
- 6) Выполнить полную идентификацию структуры индивидуальных компонентов синтезированных аналогов ГВ методом изотопной МС ИЦР ПФ.

Научная новизна

- Впервые показана возможность извлечения информации о структурной изомерии индивидуальных ароматических компонентов гуминовых веществ методами селективного изотопного обмена в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения.
- Впервые продемонстрировано сходство молекулярного состава структурных аналогов ГВ, полученных методом окислительного сочетания фенолов, и ароматических компонентов природных ГВ.
- На примере структурных аналогов ГВ впервые показано, что в источнике ионизации электрораспылением в реакции H/D обмена вступают скелетные протоны, участвующие в кето-енольной таутомерии.
- Впервые показано, что молекулярные компоненты ГВ с одинаковым количеством кислотных групп характеризуются близким элементным составом вне зависимости от источника происхождения ГВ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные по строению и молекулярному составу широкой выборки ГВ будут использованы для разработки теоретических основ молекулярной систематики природного органического вещества, основанной на идентификации общих и уникальных индивидуальных компонентов в составе образцов различного генезиса. Создание такой систематики будет способствовать пониманию эволюции органического углерода на Земле. Найденные взаимосвязи между молекулярным составом продуктов окислительной поликонденсации и структурой исходных фенольных мономеров могут лечь в основу направленного синтеза гуминоподобных систем, наиболее близких по структуре к природным ГВ. Информация о структурных фрагментах

индивидуальных компонентов ГВ является необходимой для получения прогностических моделей «структура – биологическая активность ГВ» и понимания механизма их биологической активности. Указанные модели могут стать теоретической основой для разработки политаргетных лекарств на основе ГВ.

Практическая значимость работы определяется тем, что полученные данные войдут в открытую базу данных IUPAC по компонентному составу гуминовых веществ и природного органического вещества (https://iupac.org/projects/project-details/?project_nr=2016-015-2-600). Создание «химической библиотеки» компонентов природного органического вещества станет важным инструментом для верификации данных о молекулярном составе сложных матриц, например, по частоте встречаемости молекулярных составов. Разработанный в данной работе комплекс методик введения изотопных меток и определения карбоксильных групп в индивидуальных компонентах методом МС ИЦР ПФ может быть использован для углубленного анализа биотоплив, моторных топлив и нефтей. Полученные результаты могут быть использованы в образовательных курсах по химии природного органического вещества и химии растительного сырья.

Положения, выносимые на защиту

- Результаты исследования молекулярного состава ГВ из различных источников методом МС ИЦР ПФ.
- Синтез структурных аналогов ГВ и результаты сопоставления их сходства с природными ГВ.
- Методические подходы к селективному введению изотопных меток в углеродный скелет ГВ с помощью каталитического Н/Д обмена и способ интерпретации данных изотопной МС ИЦР ПФ.
- Результаты исследования структурной изомерии ароматических компонентов угольных ГВ методами селективного изотопного обмена и МС ИЦР ПФ.
- Положение о ведущей роли кето-енольной таутомерии в реакциях Н/Д обмена скелетных протонов в источнике ионизации электрораспылением масс-спектрометра.
- Способ определения количества карбоксильных групп в индивидуальных компонентах ГВ и их распределения по молекулярному ансамблю ГВ.

Личный вклад автора состоит в написании критического обзора литературных данных; постановке экспериментов по введению дейтериевых меток в состав ГВ; подборе оптимальной процедуры пробоподготовки образцов для анализа методом МС ИЦР ПФ; интерпретации результатов масс-спектрометрии изотопного обмена. Все исследования, описанные в диссертации, выполнены лично автором. Во многих случаях эти работы проводились в рамках сотрудничества с другими российскими и зарубежными учеными.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на следующих конференциях: Вторая и Третья международные конференции отделения СНГ международного гуминового общества (МГО) НИТ 2012 и 2014, Москва,

Россия; Кластер конференций по органической химии "ОргХим-2013", Санкт-Петербург, Россия; 17-ая и 18-ая международные конференции МГО: 2014, Иоаннина, Греция, и 2016, Канадзава, Япония; Зимняя конференция молодых учёных по органической химии «WSOC2015», 2015, Красновидово, Россия; 64-ая Международная конференция Американского масс-спектрометрического сообщества АСМС-2016, Сан-Антонио, США; 2-ая Муждународная конференция "Инновации в масс-спектрометрии", 2016, Москва.

Публикации. Всего по материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них 11 статей в рецензируемых научных журналах, отвечающих требованиям высшей аттестационной комиссии, и 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Исследования выполнялись при поддержке проектов РФФИ (13-04-01853, 16-04-01753, 16-03-01057, 16-33-00914), РНФ (16-14-00167, 14-24-00114) и ИЮПАК (2016-015-2-600).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 143 страницах, содержит 10 таблиц, 16 схем и 72 рисунка. Список цитируемой литературы включает 274 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование молекулярного состава ГВ различного происхождения и фракционного состава методом МС ИЦР ПФ

Известно, что все ГВ содержат ароматическую систему, замещенную кислородсодержащими функциональными группами – карбоксильными, гидроксильными, карбонильными и метоксильными. Однако в силу экстремальной структурной гетерогенности их строение не может быть записано единственной химической формулой. Поэтому общепринятым способом представления информации об элементных, функциональных и структурных составляющих ГВ являются средние модельные структуры. Одна из таких моделей представлена на Рис. 1.

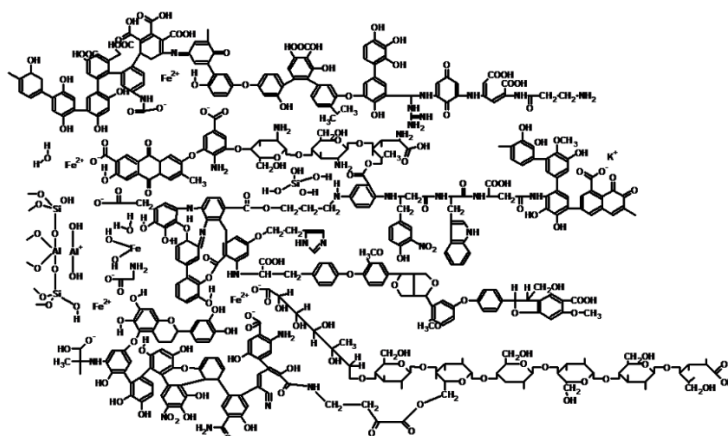


Рис. 1. Структурная модель ГВ почв по Кляйнхемпелю, 1970.

Для установления зависимости молекулярного состава ГВ от источника происхождения была сформирована обширная выборка (22 препарата) различного фракционного состава (гуминовые кислоты (ГК) (осаждаются при pH < 2), гиматомелановые

кислоты (**ГМК**) (этанольный экстракт из ГК) и фульвокислоты (**ФК**) (не осаждаются при подкислении)), выделенных из углей, торфов, почв, и природных вод. При формировании выборки особое внимание уделяли ГВ терригенного происхождения, которые гораздо хуже изучены, чем водные ГВ, из-за значительного вклада неионогенных компонентов с низкой эффективностью ионизации и неорганической матрицы в их состав. Поэтому для анализа данных препаратов методом МС ИЦР ПФ подбирали оптимальные условия электрораспыления и пробоподготовки. Эта часть работы описана в тексте диссертации.

Для исследования молекулярного состава указанной выборки ГВ применяли масс-спектрометрию сверхвысокого разрешения - МС ИЦР ПФ с ионизацией электрораспылением (ЭР), в результате чего полученные спектры содержали только молекулярные ионы. Полный список образцов и характеристики масс спектров ИЦР ПФ представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Характеристики масс-спектров ИЦР ПФ выборки ГВ и относительный вклад $C_cH_hO_oN_nS_s$ формул в суммарную интенсивность спектра (%).

Шифр	Число пиков	Mn*	CHO	CHON	CHOS	CHONS	O/C _n *	H/C _n *
Гуминовые вещества углей								
CHA-Pow7	20454	476	69	27	3	1	0.29	0.93
CHA-GI02	19396	375	45	46	3	6	0.31	0.83
CHA-SH4	16398	472	52	43	3	2	0.36	0.93
CHM-Pow7	7313	468	81	15	3	1	0.42	0.84
CHM-Irk	7054	496	77	18	4	1	0.44	0.78
CHM-GI02	7165	512	63	34	1	2	0.50	0.66
Гуминовые вещества торфов								
PHA-T798	17775	488	92	3	4	1	0.39	1.30
PHA-TTL98	12120	466	84	6	4	6	0.46	1.04
PHM-Sk300	5894	520	88	1	4	7	0.50	0.72
PHM-TTL98	9635	495	84	6	4	6	0.54	0.84
PFA-T798	12393	474	96	2	1	1	0.56	0.93
PFA-TTL98	13191	470	90	7	2	1	0.58	0.83
Гуминовые вещества почв								
SHA-Ctk04	16640	417	61	25	8	6	0.38	0.71
SHA-Pw04	30061**	459	66	16	9	9	0.37	0.95
SFA-Ctk04	21400**	488	85	10	4	1	0.55	0.98
SFA-Pw04	41380**	530	91	6	2	1	0.56	0.95
Гуминовые вещества природных вод								
SRHA	13361	477	91	4	1	4	0.58	0.82
SRFA	9979	496	95	3	1	1	0.60	0.91
SRDOM	12994	480	95	3	1	1	0.53	1.11
AHF-SSX13	11923	461	82	6	11	1	0.56	1.01
AHF-SSP13	5439	460	94	3	3	0	0.55	1.09
RHF-SSP13	11206	493	84	3	13	0	0.48	1.24

* - среднечисленные значения, ** - общее количество пиков получено суммированием спектров в узкополосном режиме съемки

В целом, все масс-спектры ИЦР ПФ гуминовых веществ характеризуются высокой сложностью – состоят из десятков тысяч пиков. Значения среднечисленных масс изменяются от 370 до 530 Да. Благодаря высокой чувствительности метода, было определено множество индивидуальных азот- и серосодержащих молекул. Однако оценка относительного вклада CHO, CHON, CHOS и CHONS формул в общую интенсивность показывает доминирующий (>85% от общего содержания) вклад CHO молекул. Исключением являются образцы ГК, выделенные из углей, особенно СНА-G102, который характеризуется высоким вкладом (46%) CHON молекул в суммарную интенсивность. Типичные масс-спектры ГВ на примере ФК вод и ГК угля приведены на Рис. 2. Основное количество пиков в масс-спектре ГВ лежит в области 200-700 m/z с максимумом интенсивности сигналов в районе 450 m/z. Масс-спектры всех образцов характеризуются мономодальным распределением. При этом распределение пиков на одной номинальной массе раскрывает основные отличия ГВ, выделенных из различных источников (Рис. 2 А,В). Так, если для водных ФК наблюдается мономодальное распределение с максимумом при $m/z = 411.05765$, который соответствует брутто-формуле $C_{17}H_{15}O_{12}$, то в случае ГК угля распределение пиков на одной номинальной массе является полимодальным с максимумами при $m/z = 411.05133$, 411.21804 и 411.34832 , отвечающим молекулярным формулам $C_{24}H_{11}O_7$, $C_{25}H_{31}O_5$ и $C_{25}H_{47}O_4$, соответственно. Такое различие в заселенности одной номинальной массы отражает большую структурную гетерогенность ГК угля по сравнению с ФК вод. При этом взаимосвязь заселенности одной номинальной массы и степени химического разнообразия наблюдалась для всех 22 образцов ГВ, исследованных в настоящей работе.

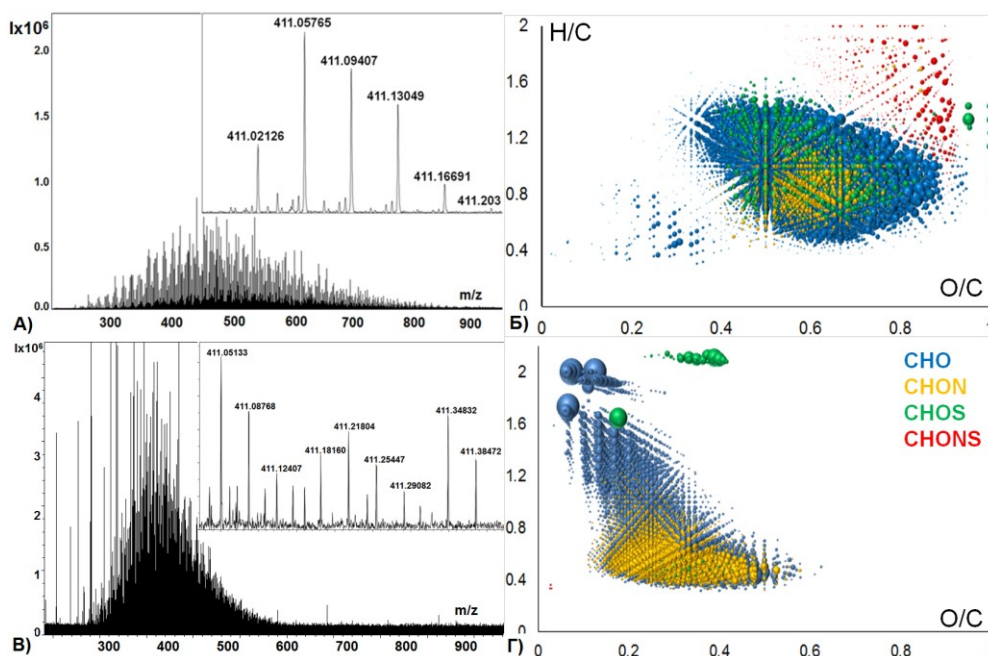


Рис. 2. Масс-спектры ИЦР ПФ с выделенной областью $m/z = 411$ и диаграммы Ван Кревелена для водных ФК - SRFA (А,Б) и угольных ГК - СНА-Pow7 (В,Г), соответственно.

Для визуализации химического пространства, занимаемого компонентами ГВ, идентифицированные формулы были использованы для расчета атомных соотношений Н/С и

O/C и нанесены на диаграмму Ван Кревелена, представляющую собой двумерную диаграмму в координатах H/C-O/C (Рис. 2 Б,Г). Оказалось, что ФК вод характеризуются доминированием окисленных ароматических соединений с $O/C > 0.5$ и $H/C < 1$, которые можно отнести к гидролизуемым таннинам. В то же время ГК угля характеризуется гораздо более высоким вкладом слабо окисленных ароматических соединений (конденсированных таннинов), лигнинных и насыщенных алифатических компонентов (Рис. 2Г).

Для сравнения образцов было рассчитано распределения молекулярных формул в составе ГВ по классам основных прекурсоров, согласно заселенности выделенных областей, на диаграмме Ван Кревелена (Рис. 3А). Рис. 3Б показывает гистограмму взвешенного по относительной интенсивности распределения молекулярных составов, усредненного по источнику ГВ.

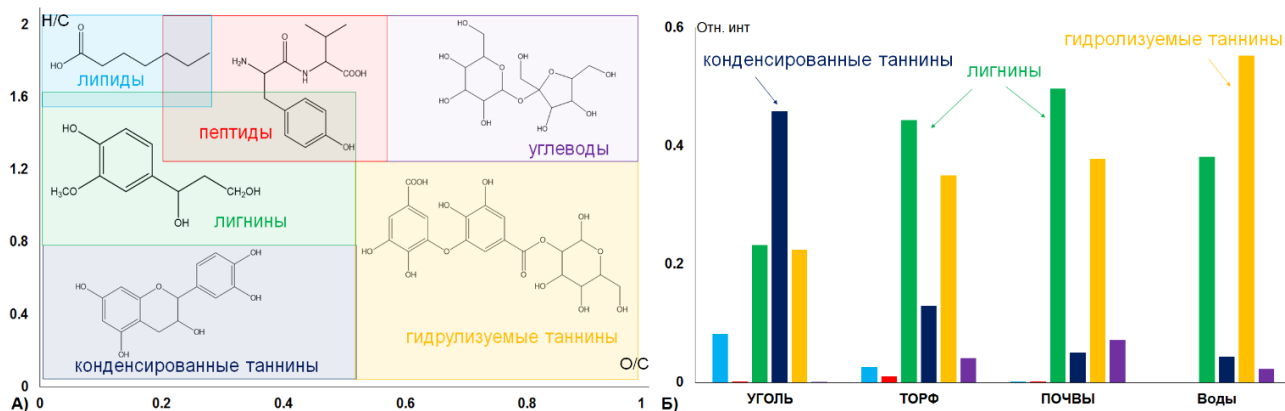


Рис. 3. А) Модельная диаграмма Ван Кревелена с выделенными областями прекурсоров ГВ. Б) Распределение формул по основным прекурсорам, усредненное по источнику ГВ.

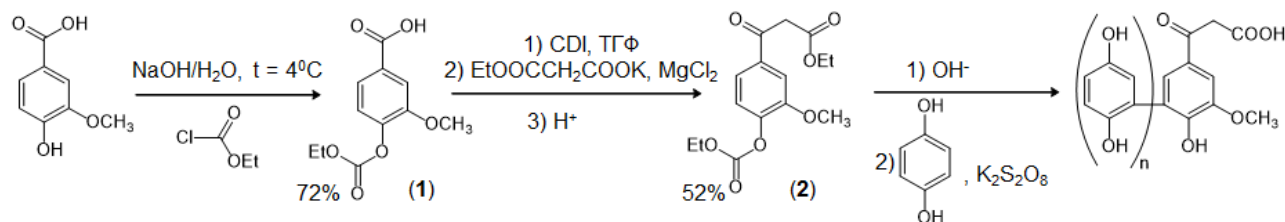
Как видно из полученных данных (Рис. 3), ароматические компоненты вносят основной вклад в молекулярный состав ГВ из всех источников. При этом отличительной особенностью угольных ГВ является максимальный вклад конденсированных таннинов, водных ГВ - гидролизуемых таннинов, а для ГВ торфа и почвы характерно максимальное содержание лигнинных компонентов и присутствие углеводных фрагментов. Таким образом, относительные вклады различных прекурсоров в молекулярный ансамбль ГВ могут выступать в качестве численных дескрипторов для сравнительного анализа ГВ. Однако, полученные данные не несут информации о химической структуре молекулярных компонентов. Для решения данной задачи были синтезированы структурные аналоги ГВ и использовано селективное введение изотопных меток.

2. Синтез структурных аналогов ГВ.

Для получения структурных аналогов ГВ была проведена окислительная поликонденсация продукта гидролиза этил 3-(4-(этоксикарбонилокси)-3-метоксифенил)-3-оксипропionate (2) с гидрохиноном в щелочных условиях с большим избытком персульфата калия по Схеме 1. Фенилпропановый мономер 2 получали путем этерификации ванилиновой кислоты с последующей конденсацией 1 с калий этилмалонатом в присутствии безводного хлорида магния. Для активации карбоксильной группы соединения 1 применяли

карбонилдидиимдазол (CDI). Структуры соединений **1** и **2** установлены на основании данных спектроскопии ЯМР.

Схема 1



Полученную реакционную смесь подкисляли до pH 2, что сопровождалось выпадением осадка ГК-подобных соединений (90 мг) (МНQ-НА). Из надосадочной жидкости выделяли ФК-подобную фракцию (МНQ-ФА) с помощью твердофазной экстракции на сорбенте Амберлит ХАД-8 (532 мг).

Модельные ГВ были исследованы методом МС ИЦР ПФ ЭР. Масс-спектры характеризовались высокой плотностью пиков однозарядных ионов в диапазоне m/z от 300 до 900 с максимумом при 400 m/z (Рис. 4). Анализ спектров позволил идентифицировать 1271 и 989 СНО формул для МНQ-ФА и МНQ-НА, соответственно.

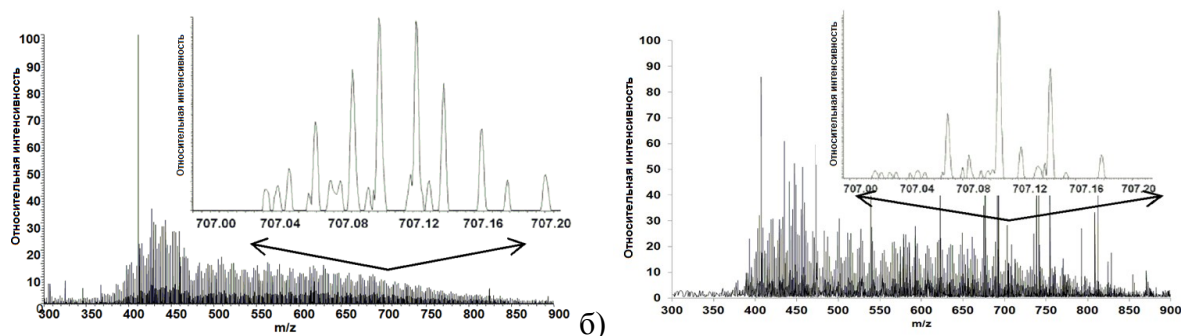


Рис. 4. Масс-спектры ИЦР ПФ модельных ГВ, полученных окислительным сочетанием фенилпропанового мономера (**2**) и гидрохинона (HQ): А) МНQ-ФА Б) МНQ-НА.

Далее данные МС ИЦР ПФ были нанесены на диаграмму Ван Кревелена (Рис. 5А).

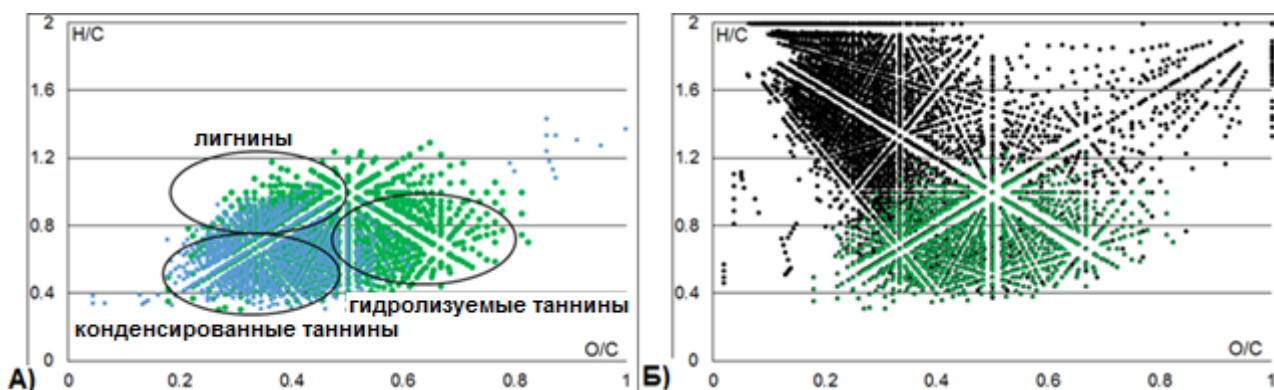


Рис. 5. Диаграмма Ван Кревелена модельных ГВ и торфяных ГК: синие точки соответствует ГК-подобной фракции (МНQ-НА), зеленые точки – ФК (МНQ-ФА), черные – торфяным ГК (РНА-Т7). Кружками отмечены типичные области прекурсоров ГВ: лигнины, конденсированные и гидролизуемые танины.

Подавляющая часть молекулярных компонентов ГК-подобной фракции располагаются в области конденсированных танинов, и совсем небольшая часть - в области лигнинов и гидролизуемых танинов. Это указывает на высокую гидрофобность данной фракции, что согласуется с осаждением МНҚ-НА при рН 2. Значительная часть компонентов МНҚ-ФА располагалась в области лигнинов и гидролизуемых танинов, что объясняет большую гидрофильность данного образца. Сравнение модельных ГВ с торфяными ГК (РНА-Т7) (Рис. 5Б) показало, что молекулярные компоненты ФК-подобной фракции в значительной мере воссоздают полифенольные фрагменты природных ГВ.

Спектры ПМР в ДМСО-d₆, для обоих образцов (Рис. 6) характеризуются наличием широкого сигнала в области ароматических и α-СН протонов, что указывает на полимерную природу образцов. Помимо этого, наблюдались хорошо разрешенные резонансы при следующих хим. сдвигах (м.д.): 3.81 (ОСН₃), 3.83 (С(О)СН₂СООН), 6.93 (протоны терминального фрагмента гидрохинона), 7.5 (ароматические протоны мономера и гидрохинона) и 2.43 (интенсивный синглет, который соответствует α-СН₃ группе).

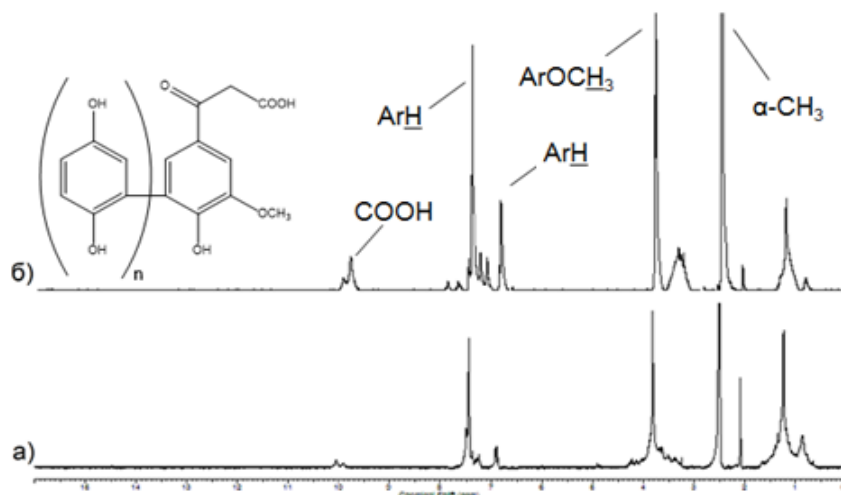
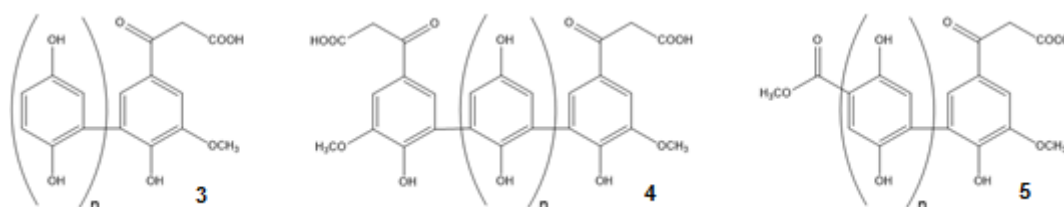


Рис. 6. Спектры ПМР модельных ГВ в ДМСО-d₆ а) МНҚ-ФА б) МНҚ-НА.

Из полученных данных можно заключить, что боковая цепь лигнинного мономера остается практически нетронутой в ходе реакции. Поэтому получающиеся молекулы можно представить структурами 3-5 (схема 2).

Схема 2



3. Определение структур индивидуальных компонентов модельных ГВ методом селективного Н/Д обмена, контролируемого МС ИЦР ПФ

Для подтверждения предложенных структур провели реакции Н/Д обмена модельных ГВ в основной и кислой средах с последующим анализом получаемых продуктов методом МС

ИЦР ПФ. Применение такого подхода основывалось на способности оснований катализировать изотопный обмен протонов, расположенных в α -положении к енолизуемым функциональным группам, в бензильных группах, в орто- и пара-положениях к фенольным группам, в то время как в кислых условиях обмену подвергаются ароматические протоны (Рис. 7А). Процедура Н/Д обмена схематически показана на Рис. 7Б).

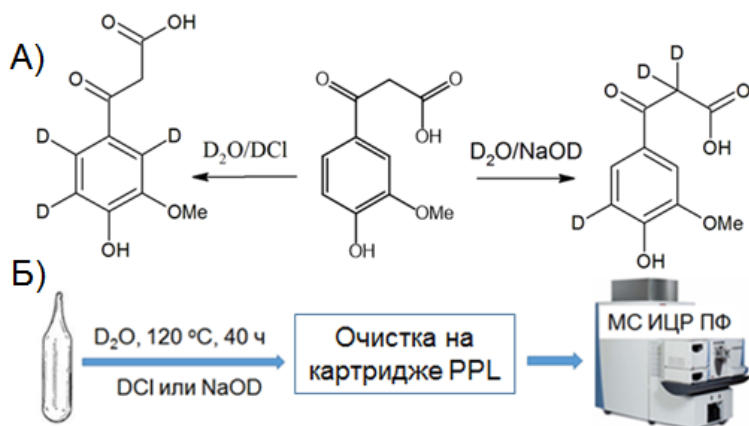


Рис. 7. А) Схемы основного и кислотного катализа реакции Н/Д обмена. Б) Схема процедуры Н/Д обмена модельных ГВ в запаянной ампуле с последующими очисткой и анализом МС ИЦР ПФ.

Раствор вещества в D₂O выдерживали в запаянной ампуле при нагревании, после чего меченый продукт выделяли твердофазной экстракцией и анализировали методом масс-спектрометрии ИЦР ПФ.

На первой стадии проводили поиск молекулярных составов, соответствующих структурам 3-5 с количеством мономеров в продуктах реакции (n) от 1 до 2. Найденные молекулы показаны на Рис. 8.

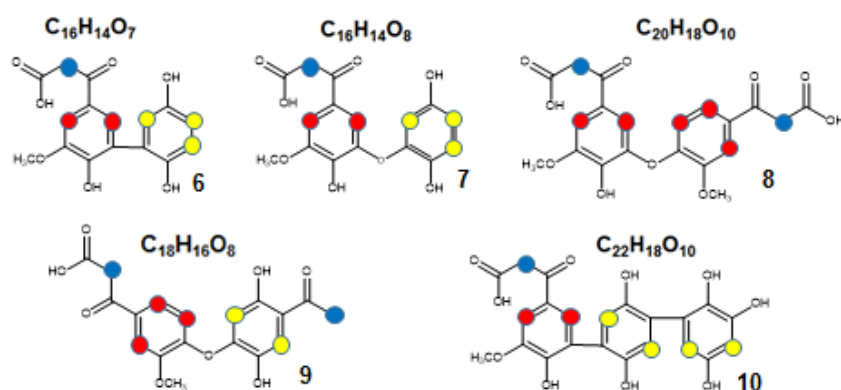


Рис. 8. Структурные изомеры в составе модельных ГВ. Синие, и красные точки обозначают положения Н/Д обмена в условиях кислотного и основного катализа, соответственно. Желтые точки обозначают центры обмена в обоих условиях.

Найденные структуры 6-10 соответствуют молекулярным формулам C₁₆H₁₄O₇, C₁₆H₁₄O₈, C₂₀H₁₈O₁₀, C₁₈H₁₆O₈ и C₂₂H₁₈O₁₀, соответственно. Соединение 6 является результатом рекомбинации радикалов М и НQ, соединения 7 и 10 представляют собой гидроксильные изомеры структуры 3 с n = 1 и 2, соответственно. Вещество 8 является димером 3-(4-окси-3-метоксифенил)-3-оксoproпионовой кислоты, которая была использована в качестве фенилпропанового мономера. Соединение 9 представляет собой ацилированный изомер структуры 5 с n=1.

Таким образом, разработанный метод Н/Д обмена скелетных протонов модельных ГВ в DCI и NaOD показывает, что введение изотопных меток в комбинации с МС ИЦР ПФ позволяет идентифицировать структурные формулы индивидуальных компонентов в составе сложных смесей.

4. Исследование влияния температуры осушительного капилляра на Н/D обмен в источнике ионизации ЭР

В рамках работы было проведено систематическое исследование возможности Н/D обмена непосредственно в источнике ионизации для ряда модельных гидроксibenзойных и аминокислот при разных температурах осушительного капилляра. В качестве растворителя выступал метанол и водно-метанольная смесь (1:1). В камеру электрораспыления помещали медную пластинку с добавлением D₂O, которая при испарении создавала атмосферу, насыщенную парами D₂O. Список исследуемых соединений и результаты Н/D обмена при обычной (200 °С) и повышенной (400 °С) температуре капилляра представлены в Таблице 2.

Таблица 2. Количество Н/D обменов в модельных соединениях при взаимодействии с D₂O при нормальной (200 °С) и высокой (400 °С) температуре осушительного капилляра.

Ионизируемая молекула	Кол-во подвижных атомов Н в анионе или катионе*	Макс. кол-во Н/D обменов при 200 °С	Макс. кол-во Н/D обменов при 400 °С**
2,4-ОН[С ₆ Н ₃]СООН (11)	2	2	4
2,5- ОН[С ₆ Н ₃]СООН (12)	2	2	2
2,3- ОН[С ₆ Н ₃]СООН (13)	2	2	3
3,4,5-ОН[С ₆ Н ₂]СООН (14)	3	3	5
4-ОН[С ₆ Н ₄]СН ₂ СН(НН ₂)СООН (15)	3	3	3
3,4-ОН[С ₆ Н ₃]СН ₂ СН(НН ₂)СООН (16)	4 или 6*	4 или 6*	7 или 9*
3,4-ОН[С ₆ Н ₃]СН ₂ СН ₂ НН ₂ (17)	5*	5*	8*
2-ОН,5-СН ₃ СО[С ₆ Н ₃]СООН (18)	1	1	4
2,2-С ₆ Н ₅ [СН]СООН (19)	0	0	1

* катионы в режиме положительных ионов, ** смесь вода-метанол (1:1 V/V) использована в качестве растворителя

В модельный ряд были включены соединения с карбоксильной группой в кольце и в боковой цепи: 2,4-дигидроксibenзойная кислота (ДГБ-2,4) (11), ДГБ-2,5 (12), ДГБ-2,3 (13), пирогалловая кислота (14), тирозин (15) и дигидроксифенилаланин (ДОФА) (16). Для сравнения были включены ароматический амин без карбоксильной группы-дофамин (17), 5-ацетилсалициловая и 2,2-дифенилуксусная кислоты (18 и 19, соответственно). Выбранные модельные соединения включали в себя широкий набор структурных фрагментов, что было необходимо для установления взаимосвязи между структурой и свойствами молекул.

При T=200°С количество изотопных обменов соответствовало теоретическому количеству подвижных протонов, присутствующих в составе исследуемых соединений (Таблица 2). Однако нагрев до 400°С приводил к увеличению количества наблюдаемых Н/D обменов для некоторых соединений. Так, в случае ДГБ-2,4 и ДГБ-2,3, наблюдали 2 и 1 дополнительных обмена, соответственно. Мы предположили, что данные обмены могут быть обусловлены Н/D обменом активных С-Н центров в ароматическом кольце, появляющихся в результате кето-енольной таутомерии. Для подтверждения данной гипотезы был проведен

H/D обмен пирогалловой кислоты в источнике ионизации в отсутствие и с добавлением NH_3 (Рис. 9). Увеличение температуры привело к обмену двух дополнительных атомов D, что указывает на H/D обмен во все C-H положения ароматического кольца. Добавление NH_3 к D_2O значительно увеличило интенсивность сигналов, соответствующих скелетным протонам. Это подтверждает предположение, что добавление основания катализирует реакцию изотопного обмена в источнике ионизации подобно реакциям в растворе.

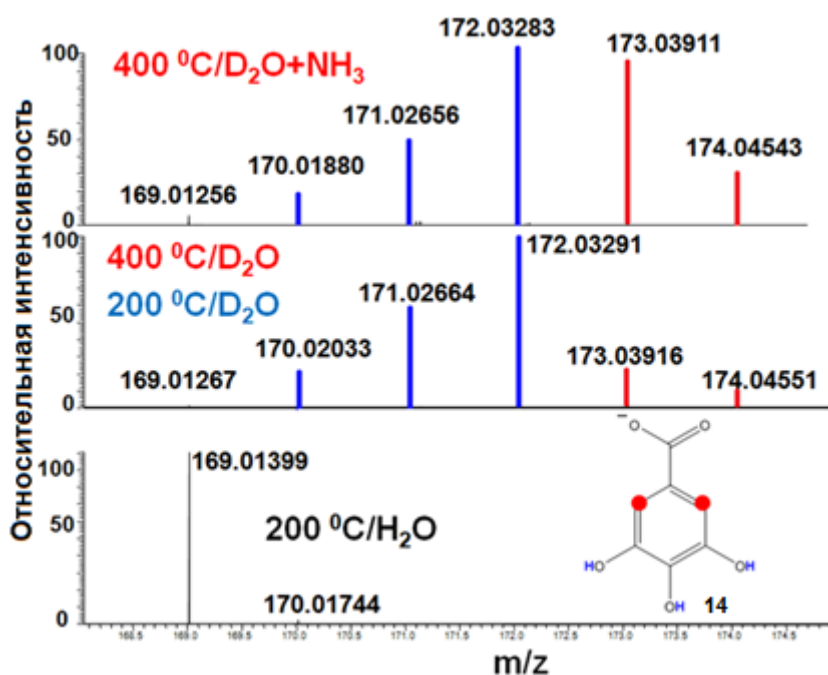
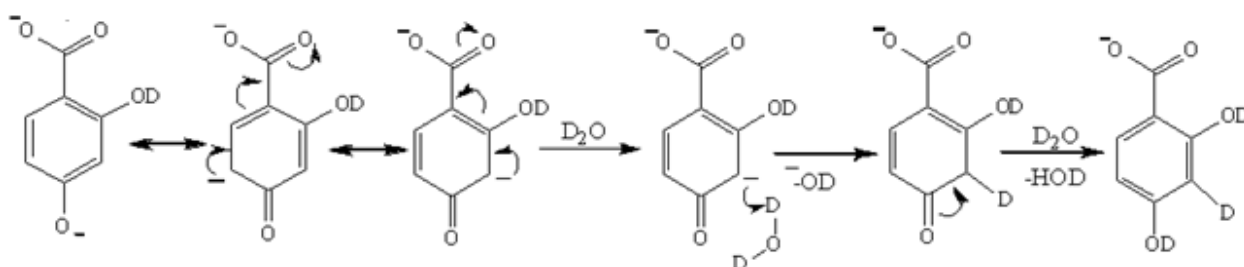


Рис. 9. Серии H/D обмена пирогалловой кислоты (14) в отсутствие и с добавлением аммиака. Обмены подвижных и скелетных протонов показаны синим и красным цветами, соответственно.

В то же время при использовании чистого метанола в качестве растворителя дополнительных обменов не наблюдалось. Разница в результатах H/D обмена в случае смеси вода-метанол и чистого метанола может быть объяснена составом заряженных микрокапель. При добавлении воды в смеси образуются OH^- -анионы, катализирующие реакцию. Таким образом, результаты исследования указывают на то, что реакции обмена протекают с молекулами в заряженных микрокаплях, а не с газофазными ионами, как это предполагалось ранее. В результате был предложен механизм H/D обмена с учетом кето-енольной таутомерии в заряженных микрокаплях (схема 3).

Схема 3



В присутствии основания при повышенной температуре осушительного капилляра происходит диссоциация ДГБ-2,4 по второй ступени с образованием феноксильного аниона. В результате таутомерии образуется карбанион в орто- и пара-положениях к фенольной группе. Далее он подвергается дейтерированию молекулой D_2O , ориентированной карбонильным кислородом, по механизму D-переноса, описанному в литературе для газофазных ионов.

5. Применение дейтериевого обмена для извлечения структурной информации из масс-спектров ИЦР ПФ гуминовых веществ

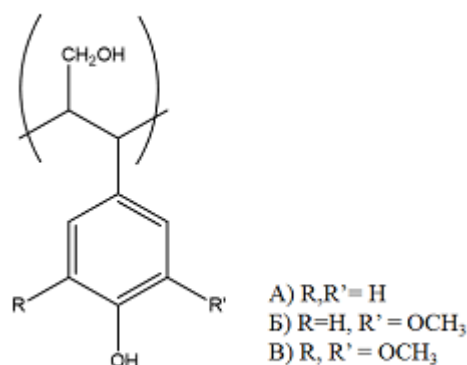
Для получения информации о структуре индивидуальных соединений в составе ГВ проводили реакции H/D обмена трех образцов гиматомелановых кислот (ГМК) угля (СНМ-Pow7, СНМ-Irk и СНМ-GI02) в основной и кислотной средах с последующим анализом получаемых продуктов методом МС ИЦР ПФ. Из масс-спектров ИЦР ПФ меченных дейтерием ГВ были математически извлечены пики, соответствующие сериям H/D обмена выбранного иона в исходном образце. Это позволило получить информацию о количестве обмениваемых в выбранных условиях протонов для конкретного соединения. В Таблице 3 представлены длины обменных серий для некоторых общих для всех ГМК формул, находящихся в областях лигнинов, конденсированных и гидролизуемых танинов.

Таблица 3. Количество H/D обменов в условиях кислотного и щелочного (в скобках) катализа в D₂O.

Формула	СНМ-Pow7	СНМ-Irk	СНМ-GI02
C ₁₆ H ₁₆ O ₇	4(5)	2(2)	2(3)
C ₁₇ H ₂₀ O ₇	4(5)	3(3)	1(3)
C ₁₇ H ₁₀ O ₇	5(4)	6(4)	4 (4)
C ₂₀ H ₁₄ O ₆	5(5)	4(1)	2(3)
C ₁₄ H ₁₀ O ₉	0(0)	4(4)	3(3)
C ₁₆ H ₁₀ O ₁₀	1(1)	4(4)	4(6)

Определение длин серий H/D обмена указывает на различия в структурах выбранных молекулярных компонентов. Обмен в кислой среде идет в ароматическом кольце. Поэтому различия в строении общих для всех образцов молекул C₁₇H₂₀O₇ и C₁₆H₁₆O₇, расположенных в области лигнинов, можно проиллюстрировать на примере модельных фенолпропановых спиртов (схема 4): паракумариловый (А), конифериловый (Б) и синапиловый (В).

Схема 4



Так, для молекул из СНМ-Pow7 было обнаружено 4 обмена, что может указывать на наличие паракумарилового фрагмента, в то время как для СНМ-GI02 и СНМ-Irk было обнаружено 2 и 3 обмена, что указывает на присутствие фрагментов синапилового и кониферилового спиртов, соответственно.

Результаты H/D обмена в основной среде являются характеристичными для строения боковой цепи в лигнинных блоках. Исходя из структуры лигнинного ароматического ядра, можно утверждать, что для соединений C₁₇H₂₀O₇ и C₁₆H₁₆O₇ мы наблюдаем 3 из 5 обменов в боковой цепи для СНМ-Pow7, так как 2 протона в о-положении к фенольной группе паракумарилового спирта так же подвергаются обмену в NaOD. В случае СНМ-GI02 все 3 обмена в основной среде относятся

к боковой цепи, так как в структуре синапилового спирта о-положения заняты OCH_3 группами. В образце СНМ-Irk мы наблюдали 3 и 2 обмена в NaOD для молекул $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_7$ и $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$, соответственно. Кониферилловый и синапиловый спирт отличаются вакантным о-положением в кольце, поэтому мы предполагаем, что боковые цепи молекул $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_7$ и $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7$ в случае образца СНМ-Irk имеют схожее строение с 2 обменными в основной среде протонами. Тем самым лигнинные компоненты бурых углей СНМ-Irk и СНМ-Gl02 имеют близкое строение ароматического ядра, в то время как образцы леонардита (СНМ-Pow7) и бурого угля (СНМ-Gl02) характеризуются схожим строением боковой цепи.

Таким образом, применение изотопного обмена позволяет отобрать наиболее вероятные структурные формулы молекулярных компонентов ГВ.

6. Распределение обменных протонов по молекулярным компонентам ГВ в кислой и основной средах

Для образца ГМК угля (СНМ-Pow) был проведен расчет длины серий Н/D обмена в условиях кислотного и основного катализа для 800 ионов с интенсивностью $> 1\%$. Результаты обменов нанесены на диаграмму Ван Кревелена, где цвета точек соответствуют количеству обменов в NaOD и DCl (Рис. 10). Как видно, области на диаграммах характеризуются различным количеством обменных протонов, которое согласуется со структурами гуминовых прекурсоров. Максимальное количество Н/D обменов (до 7) как в DCl, так и в NaOD наблюдалось для лигнинных компонентов, так как отсутствие карбоксильных заместителей приводит к эффективному электрофильному замещению всех ароматических протонов на дейтероны. Количество Н/D обменов, катализируемых DCl, увеличивается с понижением отношения Н/С и увеличением отношения О/С.

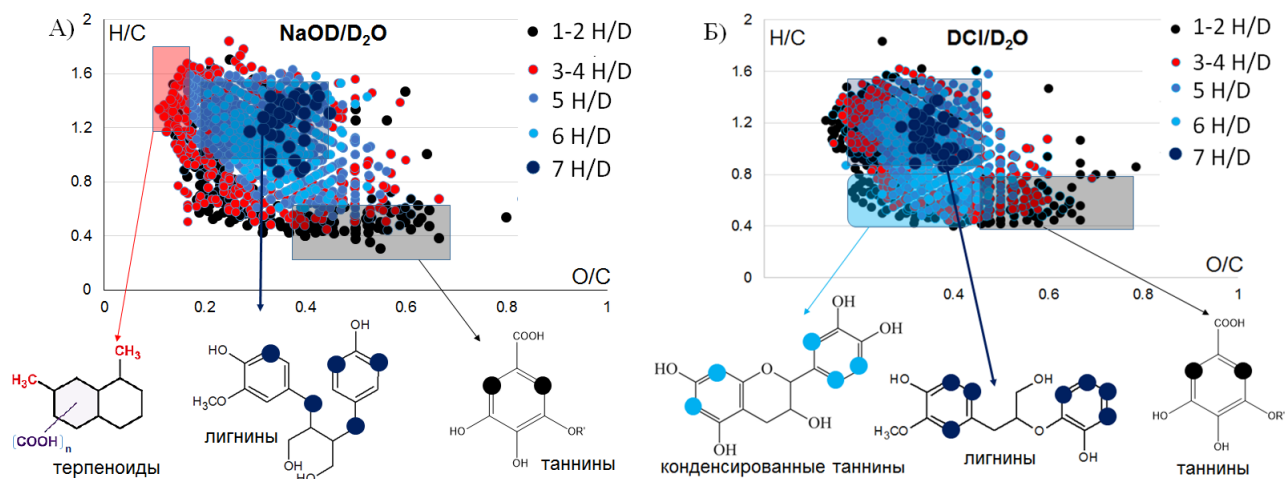
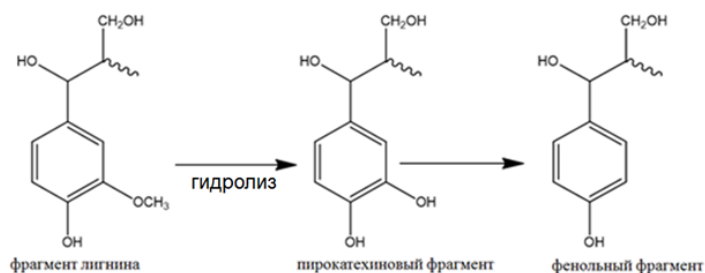


Рис. 10. Диаграммы Ван Кревелена для ГМК угля (СНМ-Pow7) с обозначенными цветами количеством Н/D обменов при действии А) NaOD, Б) DCl с гипотетическими структурами, соответствующими результатам обмена и элементным составам.

Известно, что процесс гумификации сопровождается потерей метильной и метоксильной группы в ароматическом кольце, что может приводить либо к появлению новой фенольной группы, либо ароматического протона, соответственно (схема 5).

Схема 5



Появление пирокатехиновой структуры приводит к генерации дополнительных С-Н протонов для обмена в NaOD, что мы и наблюдали при смещении по диаграмме Ван Кревелена (Рис. 9). Потеря фенольной группы сопровождается появлением

дополнительных ароматических протонов, что увеличивает количество Н/D обменов в DCl. Например, молекула $C_{20}H_{28}O_8$ имеет 6 ароматических Н, что указывает на 2 фрагмента кониферилового спирта; в то же время, $C_{19}H_{26}O_7$ отличается от $C_{20}H_{28}O_8$ на массу OCH_2 и имеет 7 ароматических Н, что указывает на потерю OCH_3 группы и приводит к появлению фрагмента паракумарилового спирта. Можно заключить, что в образце ГМК леонардита (СНМ-Рow7) содержатся молекулы лигнинов на различных стадиях гумификации. При этом увеличение количества обменных Н в кислой среде от 4 до 7 связано с превращением синапилового спирта в кониферильный и паракумарильный за счет потери OCH_3 . Таким образом, селективное введение изотопных меток в комбинации с МС ИЦР ПФ позволило различить типы фенилпропановых мономеров, входящих в состав отдельных молекул ГВ.

7. Дейтерометилирование ГВ для определения количества карбоксильных групп в составе индивидуальных компонентов

Для определения количества карбоксильных групп в составе индивидуальных компонентов ГВ мы применили реакцию дейтерометилирования (схема 6) в комбинации с МС ИЦР ПФ для трех образцов ГВ, которые характеризуются существенным различием кислотно-основных свойств: водные ФК (SRFA), ГМК угля (СНМ-Irk) и торфа (PHM-TTL).

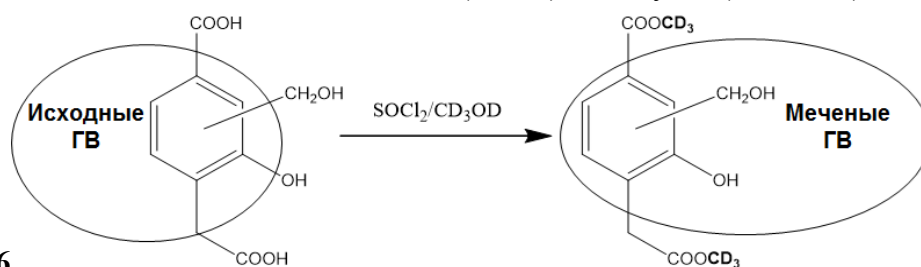


Схема 6

Серии дейтерометилированных материнских ионов извлекали из масс-спектров исходных образцов по аналогии с Н/D обменом. Данную процедуру проводили для 500 наиболее интенсивных пиков. Результаты анализа наносили на диаграмму Ван Кревелена с цветовым обозначением количества $COOH$ -групп (Рис. 11). Для выявления тенденций в распределении карбоксильных групп по молекулярным компонентам ГВ, полученные данные сравнили со структурами основных прекурсоров ГВ (Рис. 11Г). Оказалось, что найденные количества карбоксильных групп согласуются с предложенными структурами. Так, молекулы флавона или рабинозы не содержат $COOH$ - групп, и соответствующие области на диаграммах Ван Кревелена для образцов СНМ-Irk и PHM-TTL представлены соединениями, не содержащими или с 1 $COOH$ -группой.

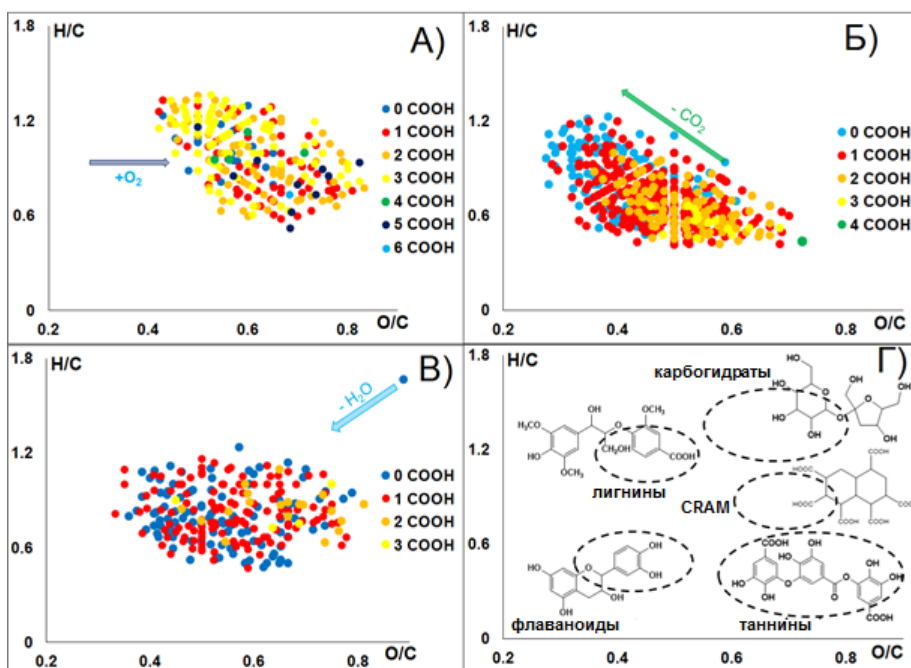


Рис. 11. Диаграмма Ван Кревелена, где количество COOH групп показано синим (0), красным (1), оранжевым (2), желтым (3), зеленым (4), тёмно-синим (5) и бирюзовым (6) цветами для образцов: А) ФК вод (SRFA), Б) ГМК угля (CHM-Irk), В) ГМК торфа (PHM-TTL). Г) прекурсоры ГВ

В то же время, гидролизуемые танины содержат значительное количество карбоксильных групп, что подтверждается высокой заселенностью этой области поликарбоксильными молекулами. Установленные закономерности распределения карбоксильных групп по молекулярному ансамблю ГВ позволили выдвинуть предположение, что путем манипуляции исходным рН можно провести эффективное разделение молекулярного ансамбля ГВ на компоненты с различным количеством и качеством кислотных групп. Проверке этого предположения был посвящен заключительный этап работ.

8. Фракционирование гуминовых веществ по кислотности молекулярных компонентов

Молекулы с различной кислотностью по-разному взаимодействуют с гидрофобным сорбентом. Поэтому была проведена пошаговая твердофазная экстракция ФК вод и ГМК угля (CHM-Irk) при рН = 7, 5, 3, 2 на картриджах PPL. Выбранные значения рН соответствовали уменьшению рКа в следующем порядке: фенолы (рКа>7), карбоксильные кислоты (рКа=5), ароматические карбоксильные кислоты (рКа>3), β -кето карбоксильные и поликарбоксильные кислоты (рКа<2.5). После элюирования каждую фракцию исследовали методом МС ИЦР ПФ. Полученные данные были нанесены на диаграмму Ван Кревелена. Данные для ГМК угля показаны на Рис. 12, для ФК вод - приведены в тексте диссертации.

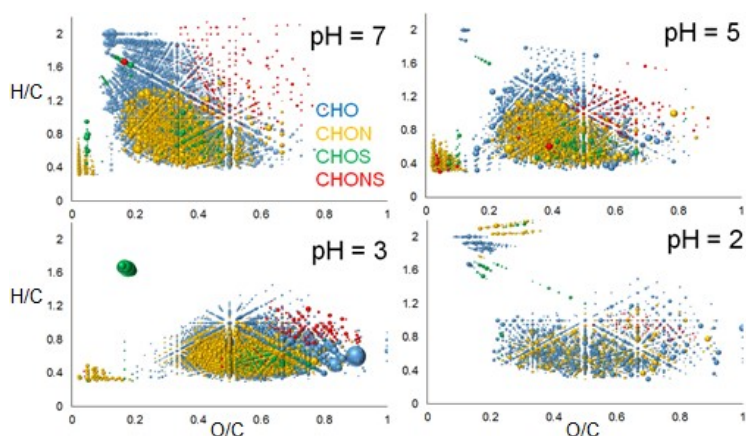


Рис. 12. Диаграмма Ван Кревелена фракций ГМК угля (CHM-Irk), выделенных на картриджах PPL при пошаговом уменьшении рН раствора. Размер точек отражает относительную интенсивность пика на масс-спектре.

На Рис. 12 видно, что распределение интенсивности по молекулярному составу смещается от насыщенных низкоокисленных соединений с $H/C > 1$, наблюдаемых при $pH = 7$, к высокоароматичным окисленным молекулам с $O/C > 0.6$ при $pH = 2$. Это согласуется с описанными в п. 7 данными о принадлежности молекул с одинаковым количеством карбоксильных групп к одному классу соединений на диаграмме Ван Кревелена. Можно заключить, что фракция, сорбирующаяся на картриджах при $pH 7$, представлена лигнинными компонентами, содержащими фенольные и спиртовые группы, и не содержащими карбоксильных групп. Фракция, сорбирующаяся при $pH 5$, содержит молекулы с карбоксильными группами, которые не сопряжены с ароматическим кольцом (окисленный лигнин). Фракции, сорбирующиеся при $pH 3$, занимают область гидролизуемых танинов с $H/C < 1$. Компоненты, выделенные при $pH 2$, можно отнести к сопряженным кето-кислотам с $pKa < 2.5$, причем данные соединения характеризуются максимальным отношением O/C .

Таким образом, впервые предложен способ фракционирования гуминовых веществ на фракции с достаточно гомогенным молекулярным составом компонентов, обладающих близкими кислотными свойствами.

Комплекс выполненных исследований убедительно продемонстрировал широкие возможности метода селективного изотопного обмена в сочетании с масс-спектрометрией сверхвысокого разрешения для извлечения структурной информации о компонентах сложных смесей на примере систем природных и модельных гуминовых веществ. Применение H/D обмена скелетных протонов позволило изучить строение ароматических компонентов природных ГВ и предложить структуры соединений в составе модельных ГВ. Определение распределения карбоксильных групп по молекулярному ансамблю ГВ показало его соответствие структурам основных гуминовых прекурсоров и позволило провести разделение гуминовых веществ по кислотности молекулярных компонентов. Развитие предложенного подхода за счет использования второго изотопа (например, ^{18}O) позволит в недалеком будущем выйти на определение структурных изомеров в составе не только модельных, но и природных гуминовых веществ.

ВЫВОДЫ

1. На основании исследования молекулярного состава ГВ методом МС ИЦР ПФ показано, что в составе угольных ГВ доминируют конденсированные таннины (> 45% от общего количества идентификаций), в торфяных и почвенных ГВ - лигнины (> 44%), в водных ГВ - гидролизуемые таннины (> 55%).
2. Установлено, что окислительная поликонденсация лигнинного мономера и гидрохинона позволяет воссоздать более 50% лигнинно-полифенольных компонентов природных ГВ. Предложен подход к определению типа структурной изомерии аналогов ГВ с помощью изотопного обмена и МС ИЦР ПФ.
3. Показано, что в условиях ионизации электрораспылением активные центры молекул, участвующие в кето-енольной таутомерии, подвергаются Н/D обмену с D₂O в заряженных микрокаплях аналогично реакциям в растворах.
4. Применение реакций селективного Н/D обмена в комбинации с МС ИЦР ПФ впервые позволило идентифицировать различные изомеры в составе ароматических фрагментов угольных ГВ: установлено, что лигнинные компоненты различаются количеством ОСН₃ – групп в ароматическом кольце, предложен порядок расположения заместителей в кольце флавоноидных фрагментов.
5. Сочетание методов дейтерометилирования и МС ИЦР ПФ впервые позволило определить количество СООН-групп в индивидуальных компонентах ГВ. Установлено, что молекулярные компоненты с одинаковым количеством СООН групп характеризуются близким элементным составом вне зависимости от источника происхождения ГВ. Впервые осуществлено разделение ГВ на фракции в соответствии с реакционной способностью их кислотных групп.

Основное содержание работы изложено в следующих публикациях:

- 1) **A. Zhrebker**, Yu. Kostyukevich, A. Kononikhin, O. Kharybin, A. I. Konstantinov, K. V. Zaitsev, E.N. Nikolaev, I.V. Perminova. Enumeration of carboxyl groups carried on individual components of humic systems using deuteromethylation and Fourier transform mass spectrometry // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2017. – V. 409. – № 9. – P. 2477-2488.
- 2) А.С. Кононихин, **А. Я. Жеребкер**, М. А. Казачков, А. С. Григорьев, Ю. И. Костюкевич, С. И. Пеков, К. В. Бочаров, И. А. Попов, И. В. Перминова, Е. Н. Николаев. Исследование молекулярного состава гуминовых веществ угля и торфа при помощи масс-спектрометрии высокого разрешения в условиях оптимального электрораспыления // *Известия РАН. Энергетика*. – 2017. – № 1. – С. 107–114.
- 3) A. Polyakov, Lebedev, V.A., Shirshin, E.A., Rumyantsev, A.M., Volikov, A.B., **A. Zhrebker**, Garshev, A.V., Goodilin, E.A., Perminova, I.V. Non-classical growth of water-redispersible spheroidal gold nanoparticles assisted by leonardite humate. *Crystal Engineering Communications*. – 2017. – V. 19. – P. 876–886.
- 4) **A. Zhrebker**, Yu I. Kostyukevich, A. S. Kononikhin, E. N. Nikolaev, and I. V. Perminova. Molecular compositions of humic acids extracted from leonardite and lignites as determined by fourier transform ion cyclotron resonance mass-spectrometry // *Mendeleev Communications*. – 2016. – V. 26. – № 5. – P. 446–448.
- 5) **A. Zhrebker**, Yu. Kostyukevich, A. Kononikhin, V.A. Roznyatovsky, I.A. Popov, Yu. K. Grishin, I.V. Perminova, E.N. Nikolaev. High desolvation temperature facilitates in esi-source H/D exchange at non-labile sites of hydroxybenzoic acids and aromatic amino acids // *Analyst*. – 2016. – V. 141. – № 8. – P. 2426–2434.
- 6) **А. Я. Жеребкер**, И. В. Перминова, А. И. Константинов, А. Б. Воликов, Ю. И. Костюкевич, А. С. Кононихин, Е. Н. Николаев. Выделение гуминовых веществ из пресных вод на твердофазных картриджах и их исследование методом масс спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье // *Журн. аналит. химии*. – 2016. – Т. 71. – № 4. – С. 390–396.
- 7) Yu. Kostyukevich, **A. Zhrebker**, A. Kononikhin, I. Popov, I. Perminova, E. Nikolaev. The investigation of the birch tar using ultrahigh resolution Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and hydrogen/deuterium exchange approach // *International Journal of Mass Spectrometry*. – 2016. – V. 404. – P. 29–34.
- 8) Yu. Kostyukevich, **A. Zhrebker**, A. Kononikhin, M. Indeykina, I. Popov, E. Nikolaev. ECD and CID fragmentation of the supermetallized complexes of substance P with K, Cs, and Ag. // *European Journal of Mass Spectrometry*. – 2016. – V. 22(2): - P. 91–95.
- 9) **A. Zhrebker**, D. Airapetyan, A. Konstantinov, Yu. Kostyukevich, A. Kononikhin, I. Popov, K. V. Zaitsev, E.N. Nikolaev, I.V. Perminova. Synthesis of model humic substances by oxidative coupling of phenylpropanoic monomer and hydroquinone: Mechanistic study using controllable H/D exchange and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry // *Analyst*. – 2015. – V. 140. – № 13. – P. 4708–4719.

- 10) I.V. Perminova, I. V. Dubinenkov, A. S. Kononikhin, A. I. Konstantinov, **A. Ya Zhrebker**, M. A. Andzhushev, V. A. Lebedev, E. Bulygina, R. M. Holmes, Yu I. Kostyukevich, I. A. Popov, and E. N. Nikolaev. Molecular mapping of sorbent selectivities with respect to isolation of arctic dissolved organic matter as measured by Fourier transform mass spectrometry // *Environmental Science and Technology*. – 2014. – V. 48. – № 13. – P. 7461–7468.
- 11) Yu. Kostyukevich, A. Kononikhin, **A. Zhrebker**, I. Popov, I. Perminova, E. Nikolaev. Enumeration of non-labile oxygen atoms in dissolved organic matter by use of $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ exchange and Fourier transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2014. – V. 406. – № 26. – P. 6655–6664.
- 12) **A. Zhrebker**, O. Kharybin, D. Waggoner, P. G. Hatcher, E. Nikolaev, I. V. Perminova. Application of selective h/d exchange coupled to fourier transform ion cyclotron resonance mass-spectrometry to investigation individual compartments of humic substances. 18th International Conference of International Humic Substances Society, Kanazawa, Japan, September 11-16, 2016. P. T–18.
- 13) **A. Zhrebker**, Yu. Kostyukevich, A. Kononikhin, V. A. Roznyatovsky, I. Popov, Yu. K. Grishin, I. V. Perminova, E. Nikolaev. In esi-source h/d exchange at non-labile sites facilitated by an increase in desolvation temperature. 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry. San-Antonio, USA, June 5-9, 2016. WP 325.
- 14) A. S. Kononikhin, Yu. Kostyukevich, **A. Zhrebker**, I. A. Popov, O. N. Kharybin, E. Kukaev, A. Konstantinov, I. V. Perminova, E. Nikolaev. In esi-source h/d exchange facilitated a structural characterization of individual compound in complex mixtures by fticr ms. 64th ASMS Conference on Mass Spectrometry. San-Antonio, USA, June 5-9, 2016. WOA.
- 15) **A. Zhrebker**, Y. Kostyukevich, A. S. Kononikhin, A. I. Konstantinov, E. N. Nikolaev, I. V. Perminova. H/D exchange of skeletal protons to develop targeted synthesis of humic-like substances. 17th Meeting of the International Humic Substances Society. Ioannina, Greece, September 1-5, 2014, P. 236–237.
- 16) **A. Zhrebker**, Yu. Kostyukevich, A.S. Kononikhin, E.N. Nikolaev, I.V. Perminova. Molecular space of coal humic acids as determined by Fourier transform ion cyclotron resonance mass-spectrometry. The Third International Conference of the CIS IHSS on humic innovative technologies“HIT-2014”, Lomonosov MSU, Moscow, Russia, Nov. 23-27, 2014, P. 198.
- 17) **А. Я. Жребкер**, Д. В. Айрапетян, М. А. Казачков, А. С. Кононихин, И. В. Перминова, Е. Н. Николаев. Синтез структурных аналогов гуминовых веществ и их анализ с помощью масс-спектрометрии ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье. Кластер конференций по органической химии "ОргХим-2013", Санкт-Петербург, 17-21 июня, 2013, С. 369.
- 18) **A. Zhrebker**, D. Airapetyan, M.A. Kazachkov, A.S. Kononikhin, I.V. Perminova. Synthesis of model humic substances and their analysis using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. The Second International Conference of the CIS IHSS on humic innovative technologies“HIT-2012”, Lomonosov MSU, Moscow, Russia, Oct. 29- Nov. 2, 2012, P. 64.

ВЫРАЖЕНИЕ ПРИЗНАТЕЛЬНОСТИ

- Автор выражает глубокую признательность руководителю работы д.х.н., проф. Перминовой И.В. за всестороннюю помощь в выполнении работы.
- Автор выражает огромную благодарность сотрудникам кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета к.ю.н. Константинову А.И., Воликову А.Б., сотруднику кафедры органической химии к.х.н. Зайцеву К.В. за помощь в создании выборки ГВ, в проведении анализов методом спектроскопии ЯМР и в интерпретации результатов
- Автор благодарит профессора, д.ф.-м.н. Е.Н. Николаева – руководителя лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ИБХФ РАН - и сотрудников лаборатории - к.ф.-м.н. Кононихина А.С., к.ф.-м.н. Костюкевича Ю.И. и Харыбина О.Н. за оказанную помощь в разработке подхода анализа меченых образцов ГВ методом МС ИЦР ПФ и за всестороннюю поддержку в работе.

А также организациям, оказавшим финансовую поддержку при выполнении данной работы:

- Международному гуминовому обществу (IHSS)
- Российскому фонду фундаментальных исследований (гранты 16-33-00914 мол_а, 13-04-01853 А, 16-04-01753 А, 16-03-01057 А)
- Российскому научному фонду (гранты 16-14-00167 и 14-24-00114)