

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ  
НА МЕЖФАЗНЫХ ГРАНИЦАХ

УДК 544.7, 544.22, 544.08, 544.032

ОБРАЗОВАНИЕ И ДИССОЦИАЦИЯ  
КЛАСТЕРОВ ПОЛЯРНЫХ АМИНОКИСЛОТ С ИОНАМИ МЕДИ  
В ПОЛЯХ ВЫСОКОЙ НАПРЯЖЕННОСТИ

© 2025 г. Е. С. Кузнецова<sup>a,\*</sup>, И. С. Пыцкий<sup>a</sup>, А. К. Буряк<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,

Ленинский пр., 31, стр. 4, Москва, 119071 Россия

\* e-mail: eskuznetsova8@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.04.2025 г.

После доработки 04.05.2025 г.

Принята к публикации 05.05.2025 г.

Изучены процессы ионизации полярных аминокислот в присутствии солей переходных металлов в качестве катионизирующих агентов. Метод электрораспылительной ионизации был использован для получения и исследования кластерных соединений аминокислот с ионами меди. Обнаружено, что полярные аминокислоты в присутствии ионов меди склонны к образованию полимолекулярных ассоциатов. В полярных аминокислотах также активно проходят процессы фрагментации, такие как декарбоксилирование и деаминирование радикальных аминогрупп. Методами масс-спектрометрии высокого разрешения показано, что при ионизации лизина происходит замыкание радикала аминокислоты в метастабильный цикл с образованием иона  $\text{NH}_4^+ \text{ COOH}$ .

**Ключевые слова:** электрораспылительная ионизация, масс-спектрометрия, кластерообразование, аминокислоты, кластерный ион, ассоциаты

DOI: 10.31857/S0044185625020039, EDN: KRNKAB

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты находят широкое применение в различных областях, в том числе участвуют в биосинтезе природных пептидов и белков. Аминокислоты, пептиды и их производные обладают различной биологической активностью, отличаются низкой термостабильностью. Как известно, аминокислоты, участвующие в образовании белков (протеогенные), классифицируют по разным признакам. По положению изоэлектрической точки различают кислые, основные и нейтральные аминокислоты, по строению боковой цепи – алифатические, ароматические и гетероциклические. Существует и классификация аминокислот по полярности боковой цепи: полярные

и неполярные аминокислоты. К неполярным относятся аминокислоты, содержащие углеводороды в качестве радикала (аланин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, триптофан). Эти аминокислоты гидрофобны и имеют незаряженный радикал. При сближении в пространстве радикалы этих аминокислот обеспечивают гидрофобное взаимодействие. Полярные, гидрофильные, незаряженные аминокислоты (глицин, треонин, цистein, тирозин, серин, аспарагин, глутамин) содержат полярные функциональные группы: гидроксильную, сульфогидрильную и амидогруппу. При сближении в пространстве их радикалы образуют водородные связи. Кислые аминокислоты имеют отрицательный заряд при pH 7.0 (аспарагиновая и глутаминовая

кислоты). Основные аминокислоты (аргинин, гистидин, лизин) положительно заряжены при рН 7.0 [1].

Большое влияние на структурные особенности аминокислот, олигопептидов и белков оказывают водородные связи. Например, стабильность белков определяется образованием водородных связей N—H···O. Элементы вторичной структуры ( $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -складки) в молекулах белков стабилизированы водородными связями. Наличие в боковом радикале функциональных групп (сульфогидрильная  $-\text{SH}$ , карбаминовая  $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})^-$ , гидроксильная  $\text{HO}^-$ , аминогруппа  $\text{H}_2\text{N}^-$ , карбоксильная  $\text{HOOC}^-$ ) оказывает влияние не только при формировании вторичной, третичной и четвертичной структур молекулы белка, но и на ее биологические функции. При различных значениях рН в водной среде эти группы отвечают за формирование электрических зарядов белковой молекулы, ее растворимость и другие физико-химические свойства [2].

Ряд работ [3, 4] связан с изучением роли водородной связи в пептидах и белках и основан на сочетании экспериментальных и расчетных методов. В работе [3] использовали комплексный подход для оценки относительных длин водородных связей, включающих фосфорилированные аминокислотные боковые цепи в молекулах серина и аспарагина, с использованием акцепторов — метилфосфата, ацетилфосфата и общих доноров — аргинина, лизина и амидной группы. Также показано, что аргинин проявляет способность к более сильному солевому связыванию с фосфорилированными боковыми цепями, чем лизин.

Значение аминокислот в жизнедеятельности живых организмов очень велико. Полярные аминокислоты увеличивают растворимость пептидов и белков в водных системах благодаря тому, что боковые группы способны образовывать водородные связи с водой. Кроме того, аминокислоты участвуют во взаимодействиях белок–белок, ферментативных реакциях и связывании лигандов. Многие белки обладают металло связывающими центрами, содержащими остатки полярных аминокислот (аспарагиновой или глутаминовой кислот).

Методы масс-спектрометрии эффективно применяют при изучении ионизации и кластеробразования аминокислот и пептидов в сочетании с хроматографическими методами разделения. Активно используют

поверхностно-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (ПАЛДИ) и метод электрораспылительной ионизации (ЭРИ). Известен ряд исследований по анализу и возможностям взаимодействия аминокислот и пептидов с ионами двухвалентных металлов Cu и Zn методами ПАЛДИ и ЭРИ [5–8]. В обзоре [9] авторы демонстрируют возможности метода масс-спектрометрии ЭРИ в исследовании нековалентных взаимодействий металл–пептид и многогранность его применения.

В работах [10, 11] авторы исследовали способность аминокислот и пептидов образовывать кластерные соединения различного типа и состава при ионизации методами ПАЛДИ и ЭРИ. Продемонстрировано преимущество электрораспылительной ионизации, обусловленное высокой скоростью, чувствительностью анализа и возможностью проведения tandemной масс-спектрометрии.

В данной статье рассмотрены возможности масс-спектрометрического исследования полярных аминокислот в присутствии солей металлов. Показано, что в присутствии солей меди происходит агрегация и распад аминокислот, причем продукты распада также способны образовывать кластерные соединения с заряженным центром в атоме металла. Эффективность образования кластеров зависит от структуры аминокислот, в том числе наличия боковых радикалов и полярности соединений. В работе использовали набор аминокислот с различной природой заместителей и структурой: аспарагин, аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, аргинин моногидрохлорид, гистидин моногидрохлорид, лизин моногидрохлорид.

## ОБОРУДОВАНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на масс-спектрометре Bruker Maxis Impact с системой масс-анализаторов Q-TOF. Условия проведения эксперимента: скорость потока раствора образца составляла 0.25 мл/мин, напряжение на капилляре — 4500 В, на скиммере — 500 В, скорость потока газа-распылителя — 4.0 л/мин, давление — 1.4 бар. В работе использовали аминокислоты фирмы “Merck” (США) — аспарагин, аспарагиновую кислоту, глутамин, глутаминовую кислоту, аргинин моногидрохлорид, гистидин моногидрохлорид, лизин моногидрохлорид. Чистота всех соединений составляет  $\geq 98\%$ .

MC- и MC/MC-спектры были получены в положительных ионах и отрицательных ионах. Энергия распада в MC/MC-эксперименте подбиралась в диапазоне от 10 до 70 эВ с шагом в 5 эВ.

В качестве объектов исследования выбраны аминокислоты с различными радикалами боковой цепи: полярные, гидрофильные, незаряженные (аспарагин и глутамин) с амидной группой в радикале, полярные отрицательно заряженные аминокислоты (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), положительно заряженные основные аминокислоты (аргинин, гистидин, лизин). Растворы аминокислот в концентрации 0,4 мг/мл ацетонитрил/вода ( $v/v = 50/50$ ) смешивали с раствором соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  в концентрации 40 мг в 10 мл. Полученные растворы анализировали методом электрораспылительной ионизации. Для определения соединений подбирали брутто-формулы по точной массе иона и фрагментировали молекулы методом tandem-ной масс-спектрометрии для восстановления структуры по осколочным ионам.

## ОБСУЖДЕНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ

В работе проведено масс-спектрометрическое исследование электрораспылительной

ионизации полярных заряженных и незаряженных аминокислот с различными радикалами боковой цепи в присутствии солей меди. Наличие ионов меди в растворе инициирует агрегацию молекул аминокислот с образованием ряда кластеров различного состава.

Рассмотрим ионизацию полярных, незаряженных аминокислот (аспарагин и глутамин), содержащих дополнительную аминогруппу в радикале. На рис. 1 и 2 приведены масс-спектры ЭРИ этих аминокислот в присутствии солей меди. В обоих масс-спектрах доминирует молекулярный ион аминокислот  $M + \text{H}^+$ . Для молекулы глутамина (с молекулярной массой 146 Да) получен кластер  $M + \text{Cu}^+$ . Кроме того, в полученном масс-спектре присутствуют декарбоксилированный ион  $M - \text{COOH}$  и высокоинтенсивный кластерный ион  $M - \text{COOH} + \text{Cu}^+$  аминокислоты. Из представленных данных видно, что для аминокислот в присутствии солей меди характерно декарбоксилирование протонированного иона. В масс-спектре глутамина с добавлением солей меди (рис. 1) обнаружен кластерный ион состава  $M + \text{COOCu}^+$ . Это позволяет предположить, что помимо декарбоксилирования в процессе ионизации аминокислот может происходить и присоединение карбоксильной группы иона меди. Также в масс-спектре ЭРИ глутамина с добавлением

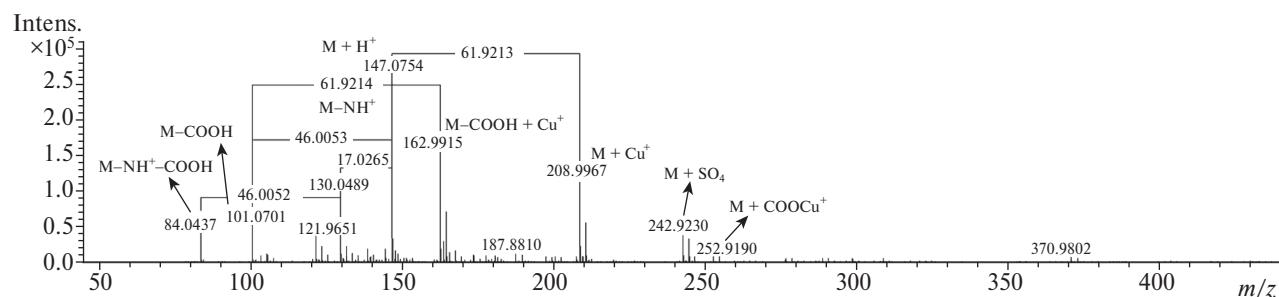


Рис. 1. Масс-спектр ЭРИ глутамина с добавлением раствора соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ .

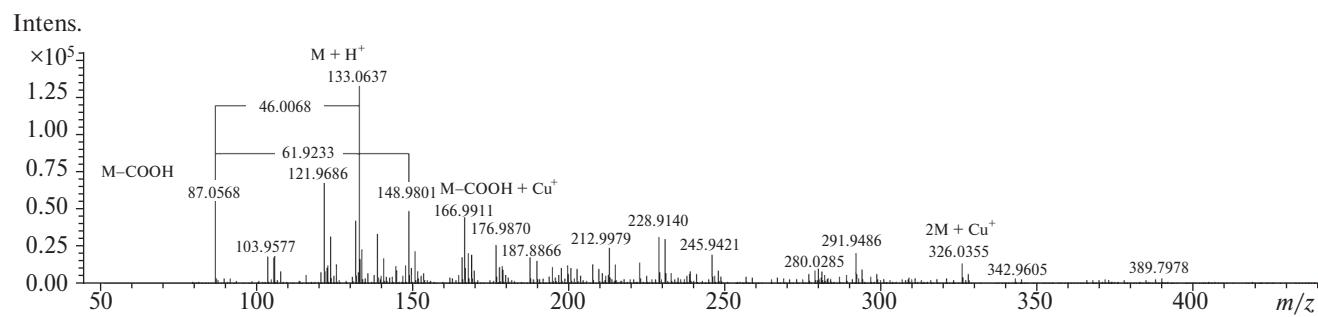


Рис. 2. Масс-спектр ЭРИ аспарагина с добавлением раствора соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ .

раствора соли меди идентифицирован ион  $M-NH^+$  (с массой 130 Да), то есть наблюдается деаминирование аминокислоты и затем декарбоксилирование с образованием иона  $M-NH^+-COOH$  (с массой 84 Да). В масс-спектре аспарагина в присутствии солей меди преобладают молекулярный ион, декарбоксилированный ион аминокислоты  $M-COOH$  и кластерный ион  $M-COOH + Cu^+$ . Таким образом, можно отметить, что ионизация глутамина и аспарагина в присутствии ионов меди протекает по схожим механизмам, что, вероятно, обусловлено схожей структурой этих соединений. Следует отметить, что при активном распаде молекул аминокислот процессы кластерообразования происходят с участием полярных фрагментов молекул, таких как амино- и карбоксильные группы. Также процесс деаминирования, происходящий в молекуле глутамина, совершенно нехарактерен для аспарагина. Учитывая, что аминокислоты являются гомологами, можно утверждать, что на стабилизацию заряда в деаминированной аминокислоте значительно влияет длина углеродной цепи, которая позволяет размазывать заряд иона и стабилизировать его в условиях ионизации.

Теперь перейдем к особенностям ионизации полярных отрицательно заряженных аминокислот (аспарагиновая и глутаминовая аминокислоты). В масс-спектре глутаминовой аминокислоты (рис. 3) с добавлением раствора соли меди обнаружены высокоинтенсивные молекулярный ион  $M + H^+$ , кластерный ионы  $M-COOH + Cu^+$  и  $M + Cu^+$  небольшой интенсивности и кластерный ион  $M + COOCu^+$ . В масс-спектре выявлены пики, соответствующие ионам  $M + SO_4^+$ , что свидетельствует о присоединении сульфатной группы. Также в масс-спектре глутаминовой аминокислоты следует отметить и образование крупного кластерного иона  $M-COOH + 2Cu^+ + H_2O$ . Для ионизации аспарагиновой аминокислоты в присутствии солей меди характерно наличие в масс-спектре высокоинтенсивного молекулярного иона  $M + H^+$ , декарбоксилированного иона аминокислоты  $M-COOH$  и кластерного иона  $M-2COOH + Cu^+$  (рис. 4). Из представленных данных видно, что для ионизации полярных аминокислот так же, как для глутамина и аспарагина, характерно декарбоксилирование

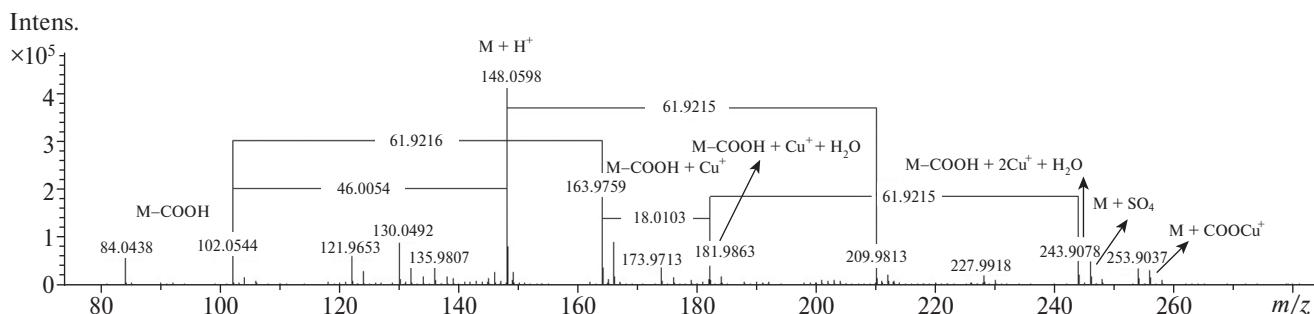


Рис. 3. Масс-спектр ЭРИ глутаминовой аминокислоты с добавлением раствора соли  $CuSO_4 \cdot 8H_2O$ .

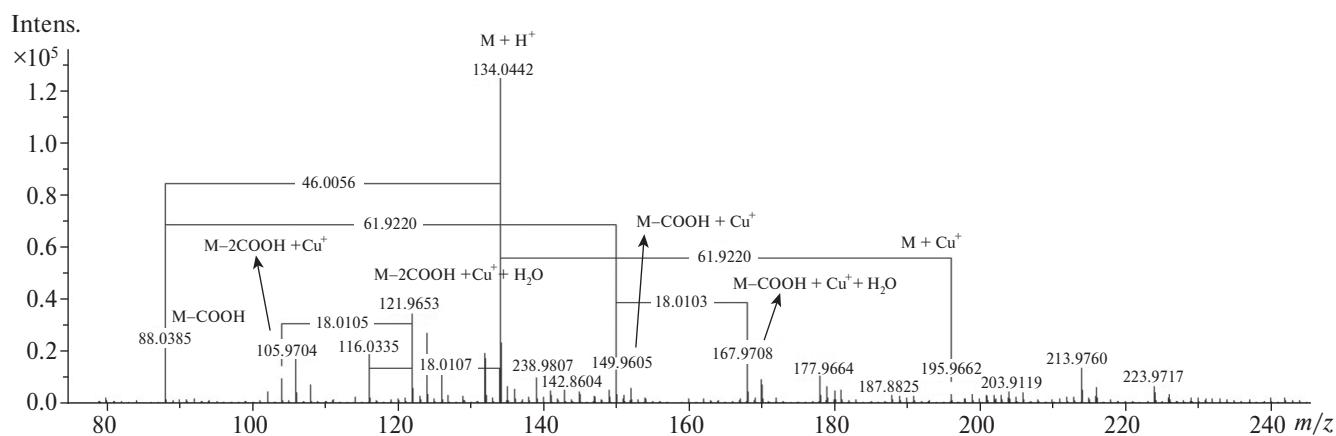


Рис. 4. Масс-спектр ЭРИ аспарагиновой аминокислоты с добавлением раствора соли  $CuSO_4 \cdot 8H_2O$ .

с последующим присоединением иона меди. Учитывая значительную полярность аминокислот, для них характерно проявление свойств цвиттер-ионов, которые образуют ассоциаты не только с медью, но и с ее противоионом. Также следует отметить, что для аспарагиновой аминокислоты характерно образование дважды декарбоксилированного иона за счет перехода заряда на аминогруппу в  $\alpha$ -положении. В глутаминовой аминокислоте такой ион малостабилен из-за длинной углеродной цепи.

Ионизация положительно заряженных основных аминокислот в растворе солей меди отличается образованием крупных кластеров различного состава. В данной работе в качестве примера приведен масс-спектр гистидина в присутствии солей меди (рис. 5). В полученном масс-спектре помимо высокоинтенсивных молекулярного иона, кластерного иона  $M + Cu^+$  и  $M-COOH + Cu^+$  выявлены крупные кластеры аминокислоты следующего состава: кластер  $(M + Cu^+) + M-COOH + Cu^+$  с молекулярной массой 388.9 Да, кластеры  $2M + 2Cu^+ + SO_4$  с молекулярной массой 530.9 Да и кластер  $4M + 2Cu^+$  с молекулярной массой 748.9 Да. Этот составной ион является продуктом взаимодействия молекулы аминокислоты с собственным фрагментным ионом.

Для исследования механизма кластерообразования был проведен tandemный MS/MS-анализ по крупным кластерным ионам 388.9, 530.9, 748.9 (рис. 6 и 7). Из представленных данных видно, что ион 748.9 распадается на ионы 595.8 Да, что соответствует  $M + 2Cu^+-M + H^+$ , 549.8 Да, который образует кластер  $4M + 2Cu^+-M-COOH$  и небольшие кластерные ионы 433.9 Да ( $2M + 2Cu^+$ ), молекулярный ион аминокислоты (156 Да) и кластерный ион гистидина с медью  $M + Cu^+$  (218 Да). Таким образом, MS/MS-анализ подтверждает состав полученного кластерного иона с массой 748.9 Да и демонстрирует способности молекулы гистидина в присутствии солей меди образовывать кластеры различного состава от небольших кластеров  $M + Cu^+$  до кластеров  $4M + 2Cu^+-M-COOH$  и  $2M + 2Cu^+$ . На рис. 7 приведен MS/MS-спектр по 530.9 и 388.9 ионам гистидина с добавлением раствора соли. Ион 530.9 дает в своем распаде высокоинтенсивные пики иона с массой 388.9 и иона с массой 251.9 Да, соответствующего  $M-COOH + Cu^++CuO$ . В этом масс-спектре также присутствуют кластерный ион аминокислоты и декарбоксилированные кластерные ионы с медью. В MS/MS-спектре по иону 388.9 Да были получены пики декарбоксилированного иона аминокислоты и кластера аминокислоты с медью состава  $M-COOH + Cu^+$ .

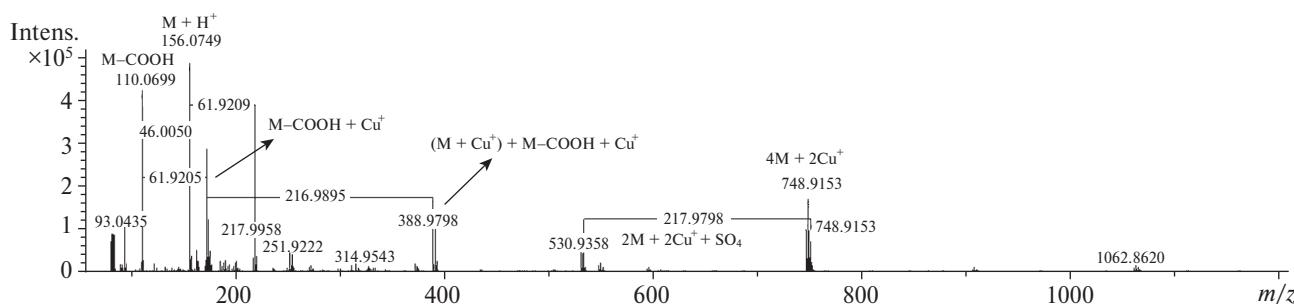


Рис. 5. Масс-спектр ЭРИ гистидина с добавлением раствора соли  $CuSO_4 \cdot 8H_2O$ .

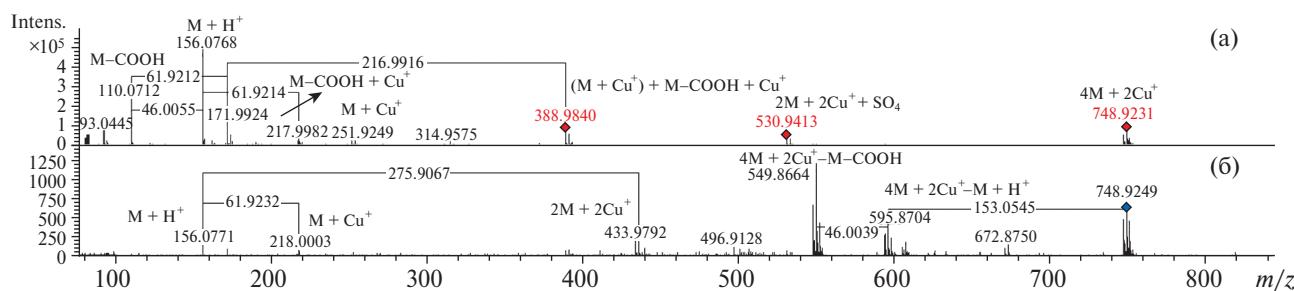


Рис. 6. Общий масс-спектр (а) и MS/MS-спектр по 748 иону гистидина (б) с добавлением раствора соли  $CuSO_4 \cdot 8H_2O$ .

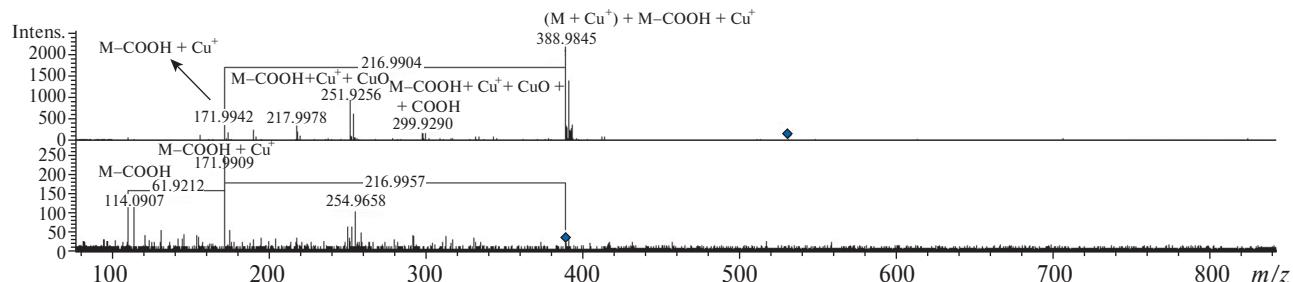


Рис. 7. MS/MS спектр по 530 и 388 ионам гистидина с добавлением раствора соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ .

MS/MS-анализ спектров гистидина с добавлением солей меди позволил выявить возможные пути фрагментации аминокислоты и кластерных ионов. Схема образования крупного кластера гистидина, состоящего из двух молекул аминокислоты и солей меди,  $\text{M} + \text{Cu}^+ + \text{M}-\text{COOH} + \text{Cu}^+$ , приведена на рис. 8. Образование подобных кластеров, димеров и тетramerов гистидина с солями меди, вероятно, объясняется структурой аминокислоты — наличием пятичленного цикла с аминогруппой в радикале, который в сочетании с атомом меди может проявлять комплексообразующие свойства, как было показано в работе [12].

В масс-спектре ЭРИ аргинина (рис. 9) с добавлением солей меди получены высокоинтенсивные молекулярные ионы аминокислоты, декарбоксилированный ион  $\text{M}-\text{COOH}$  и кластерный ион  $\text{M}-\text{COOH} + \text{Cu}^+$ . Перейдем к рассмотрению особенностей ионизации аминокислоты лизина

в присутствии солей меди (рис. 10). В масс-спектре идентифицированы высокоинтенсивный молекулярный ион, кластерные ионы  $\text{M}-\text{COOH} + \text{Cu}^+$  и  $\text{NH}_4\text{COOH} + \text{Cu}^+$ . Из представленных данных видно, что активно происходят процессы декарбоксилирования и деаминирования лизина в растворе соли меди и образование кластерных ионов. Показано, что молекулы основных аминокислот в присутствии солей меди способны образовывать крупные кластеры, включающие до 2-х, 4-х молекул с последовательным присоединением кластера  $\text{M} + \text{Cu}^+$ . Особо следует отметить нехарактерное для других аминокислот образование иона  $\text{NH}_4\text{COOH}$  и его ассоциатов. Учитывая малую вероятность столкновения отдельных амино- и карбоксигрупп, следует признать, что ионы являются свидетельством образования цикла из углеродной цепи лизина с концами, замыкающимися по карбоксильной и аминогруппе (рис. 11).

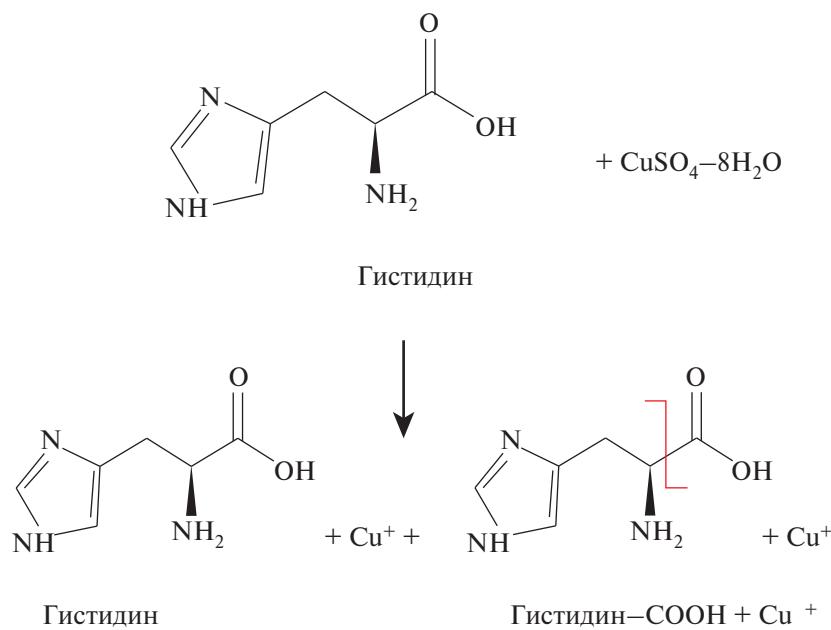


Рис. 8. Схема образования кластера гистидина с солями меди.

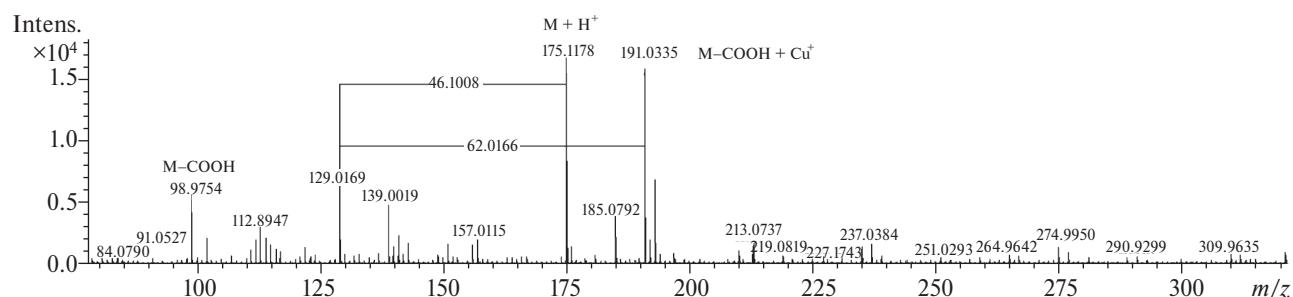
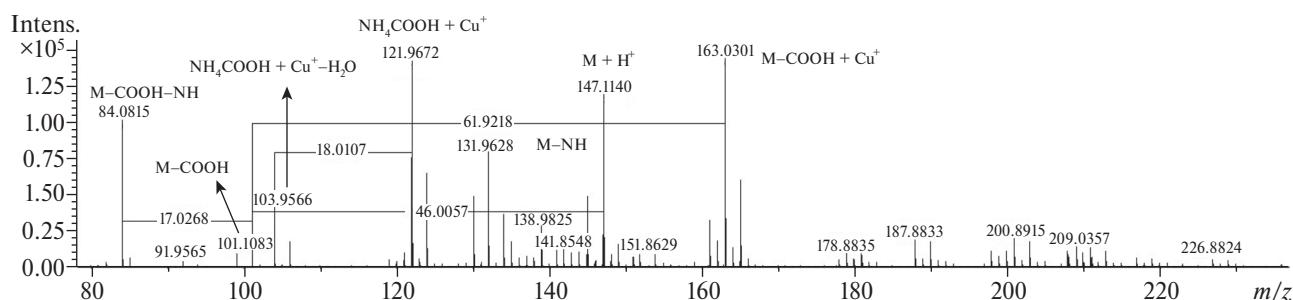
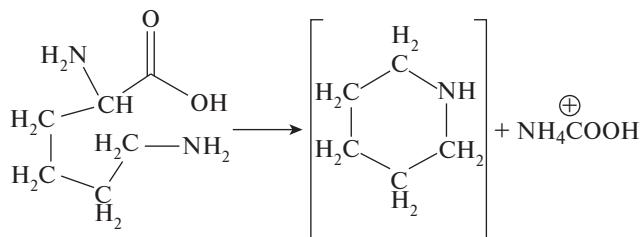
Рис. 9. Масс-спектр ЭРИ аргинина с добавлением раствора соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ .Рис. 10. Масс-спектр ЭРИ лизина с добавлением раствора соли  $\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ .

Рис. 11. Образование метастабильного шестичленного цикла лизина с выбросом карбоксильной группы и радикальной аминогруппы.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ионизация полярных аминокислот методом ЭРИ характеризуется образованием протонированных молекулярных ионов и крупных кластерных ионов, катионированных солями меди. Тандемная масс-спектрометрия показала, что вокруг одного заряженного центра металла может ассоциироваться до 2-х или 4-х молекул аминокислот, в том числе декарбоксилированных. Кроме того, получены сложные кластеры, состоящие из двух молекул аминокислот, координированных двумя заряженными центрами меди. При использовании масс-спектрометрии ЭРИ образуется широкий ряд кластеров полярных аминокислот различного состава. MS/MS-спектры, полученные для

гистидина, позволили предположить возможные пути фрагментации аминокислоты и их кластеров с солями меди. Помимо присоединения солей меди к молекулярным ионам аминокислот происходит их декарбоксирование и деаминирование при ионизации. Тандемная масс-спектрометрия крупных кластерных ионов показала, что образование полимолекулярных ассоциатов идет по комплексообразующему механизму, как и в случае с пептидами. Установлено, что геометрия соединений оказывает влияние на образование кластеров, при этом важным фактором является наличие нескольких аминогрупп или пятичленного цикла в структуре аминокислоты. Обнаружено, что полярные аминокислоты в слабой степени проявляют свойства цвиттер-ионов. Также впервые экспериментально показано, что аминокислоты с длинной углеродной цепью (не менее 5 атомов углерода) имеют стерические возможности для образования метастабильного цикла за счет сближения карбоксильной и аминогруппы радикала.

В работе показано, что использование возможностей масс-спектрометрии высокого разрешения в сочетании с источниками “мягкой” ионизации открывает широкие перспективы для изучения метастабильных состояний молекул в неравновесных состояниях и получения углубленных знаний о физико-химических свойствах аминокислот и других биологически активных соединений.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации по государственному заданию № 125012200629-9 и № 125012200583-5.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985. 456 с.
2. Болотин С.Н., Буков Н.Н., Волынкин В.А., Панюшкин В.Т. Координационная химия природных аминокислот. М.: Изд-во ЛКИ, 2007. 238 с.
3. Huughues-Despointes B.M.P., Baldwin R.L. // J. Biochemistry. 1997. V. 36. 8. P. 1965.  
<https://doi.org/10.1021/bi962546x>
4. Mandell D.J., Chorny I., Groban E.S. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. 4. P. 820.  
<https://doi.org/10.1021/ja063019w>
5. Ju X., Cheng Sh., Li H. et al. // Food Chemistry. 2022. V. 390133146.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133146>
6. Iavorschi M., Lupăescu A., Darie-Ion L. et al. // Pharmaceuticals. 2022. V. 15(9). 1096.  
<https://doi.org/10.3390/ph15091096>
7. Kim B.-R., Kim H.-T. // Bull. Korean Chem. Soc. 2007. V. 28. № 5. P. 840.  
<https://doi.org/10.5012/bkcs.2007.28.5.840>
8. Murariu M. // International Journal of Mass Spectrometry. V. 351. 2013. P. 12–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.05.009>
9. Carlton D.D. Jr., Schug K.A. // Analytica Chimica Acta. V. 686. 2011. P. 19.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.050>
10. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. 2020. V. 56. № 2. P. 272.  
<https://doi.org/10.1134/S2070205120020203>
11. Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. 2022. V. 58. № 6. P. 1135.  
<https://doi.org/10.1134/S2070205122060144>
12. Kuznetsova E.S., Pytsky I.S., Buryak A.K. // Russian Journal of Physical Chemistry A. 2025. V. 99. № 1. P. 98.  
<https://doi.org/10.1134/s0036024424702686>