

УДК 547.022

DOI 10.26456/vtchem2022.3.10

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *L*-ЦИСТЕИНСУЛЬФОНОВОЙ КИСЛОТЫ

О.В. Лусина¹, Т.В. Берестова¹, Л.Г. Кузина¹,
А.Н. Лобов², А.Г. Мустафин¹

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа

² ФГБНУ «Уфимский институт химии УФИЦ РАН», г. Уфа

Методами спектроскопии ИК- и ЯМР ¹H и ¹³C с использованием теоретических расчетов (программы ChemDrawUltra, Marvin, ACD/Labs) изучены спектральные характеристики *L*-цистеинсульфоновой кислоты (*L*-cysSO₃H) в растворах в виде частично протонированной формы (SO₃⁻)CH₂CH(NH₃⁺)COO⁻ (pH=3) и депротонированного иона (SO₃⁻)CH₂CH(NH₂)COO⁻ (pH=10).

Установлено, что в отличие от спектров ЯМР ¹H *L*-цистеинсульфоновой кислоты, в спектрах ЯМР ¹³C не наблюдается сильного смещения химических сдвигов относительно друг друга в зависимости от pH среды, что позволяет провести интерпретацию *L*-цистеинсульфоновой кислоты в растворе различной степени кислотности методом спектроскопии ЯМР ¹³C.

Ключевые слова: *L*-цистеинсульфоновая кислота, спектроскопия ЯМР ¹H и ¹³C, программа ChemDrawUltra, программа Marvin, программа ACD/Labs.

Известно, что *L*-цистеинсульфоновая (цистеиновая) кислота (*L*-cysSO₃H(1)) может являться одним из продуктов окисления *L*-цистеина с помощью пероксида водорода (H₂O₂), а также других активных форм кислорода (АФК) [1]. Наряду с образованием *L*-цистеинсульфоновой кислоты в процессе окисления, как правило, образуются *L*-цистин, *L*-цистеинсульфеновая и *L*-цистеинсульфиновая кислоты.

Подобные окислительные реакции *L*-цистеина протекают и в организме человека, и так или иначе связаны с метаболическими нарушениями, способными привести к сердечно-сосудистым заболеваниям [2, 3], диабету [4], онкологическим заболеваниям [5, 6] и болезни Паркинсона [7].

Было подсчитано, что до 5% остатков клеточного *L*-цистеина находится в организме в форме *L*-цистеинсульфиновой или цистеиновой кислот [8]. Установлено, что в условиях, при которых концентрация АФК возрастает в достаточной степени, чтобы превысить окислительно-восстановительную буферную способность клетки, может произойти необратимое окисление остатков цистеина до *L*-

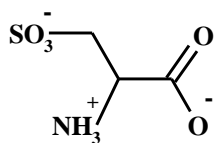
цистеинсульфоновой кислоты [9]. Также известно, что путем преобразования *L*-цистеинсульфоновой кислоты происходит синтез различных биологически активных соединений, в частности, таурина.

Так, японские ученые [10] недавно выяснили, что цистеиновая кислота влияет на содержание таурина в организме и экспрессию генов, синтезирующих таурин и гормон роста у японской камбалы *Paralichthys olivaceus*. Также показано, что цистеин *Cys106*, содержащийся в белке *DJ-1*, окисленный до цистеиновой кислоты структурно дестабилизирует димерное состояние *DJ-1*, которое является его биоактивной конформацией. Такая потеря функций приводит к снижению способности белка *DJ-1* защищать организм от окислительного стресса и может привести к ускоренному прогрессированию заболевания [11]. Кроме того, цистеиновая кислота является важным маркером окислительного стресса. Так, исследования корейских ученых [12], выявили, что повышенный уровень цистеиновой кислоты в сыворотке крови у пациентов с риском развития острого инфаркта миокарда может служить перспективным биомаркером для раннего выявления болезни.

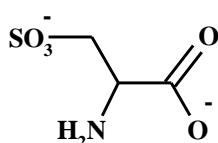
Как правило, интерпретация *L*-цистеиновой кислоты в растворах осуществляется методом хромато-масс-спектрометрии, благодаря которой можно обнаружить даже небольшое количество соединения в реакционной среде. Также, используются методы ЯМР- и ИК-спектроскопии [13-16], которые позволяют проводить структурные и молекулярные исследования с участием серосодержащих аминокислот [17-18], в том числе цистеинсульфоновой кислоты в растворах [19].

Тем не менее, серосодержащие аминокислоты, в частности, *L*-цистеин, имеют разрозненный характер в ЯМР спектрах ^1H в зависимости от pH среды [20-21], что затрудняет их интерпретацию в растворах.

С целью установления критериев для интерпретации *L*-цистеинсульфоновой кислоты в растворе в зависимости от pH среды, в данной работе были изучены экспериментальные и теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C *L*-цистеиновой кислоты (1) в виде частично протонированной формы $(\text{SO}_3^-)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (2) (pH=3) и депротонированного иона $(\text{SO}_3^-)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ (3) (pH=10).



(2)



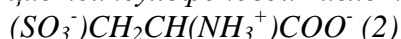
(3)

Все реагенты и химикаты были закуплены в коммерческих организациях («AppliChemPanreas» ITWCompanies, SigmaAldrich) и были использованы без дальнейшей очистки. Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

Спектры ЯМР¹³C были записаны на оборудовании ЦКП «Химия» УФИХ УФИЦ РАН – импульсный спектрометр BrukerAvance III с рабочей частотой 500.13 МГц (¹H) и 125.47 МГц (¹³C) с использованием D₂O. ИК-спектры регистрировали в диапазоне 450-3700 см⁻¹ с использованием Фурье-спектрометра FTIR-8400S (Shimadzu) при комнатной температуре. Разрешение – 4 см⁻¹, количество сканирований 20.

Теоретические расчеты были проведены с применением программ ChemDrawUltra [22], Marvin [23] и ACD/Labs [24].

Получение L-цистеинсульфоновой кислоты в виде иона

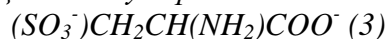


Синтез проводили на основе методики [25]. В колбу объемом 100 мл, оснащенную термометром и установленную на магнитной мешалке, помещали 0,12 г (0.50 ммоль) L-цистина на ледяной бане при температуре 3-5°C. Затем добавляли 2.6 мл HCOOH (98%) и 0.5 мл HCl конц. Получали белую суспензию. После этого к полученной суспензии при комнатной температуре при непрерывном перемешивании добавляли 0.5 мл 20% H₂O₂. Реакцию проводили в течение 150 мин. Реакционный раствор высушивали в вакууме при 100°C на роторном испарителе в течение 15 мин. Полученную твердую фракцию промывали дистиллированной H₂O, и, добавляя по каплям конц. NH₃ при постоянном перемешивании и охлаждении на ледяной бане, доводили pH до 3. На ночь колбу с реакционным раствором оставляли в холодильнике. L-цистеинсульфоновая кислота в виде иона (SO₃⁻)CH₂CH(NH₃⁺)COO⁻ (2) была выделена из жидкой фракции после центрифугирования реакционного раствора.

ИК (KBr), см⁻¹(SO₃⁻)CH₂CH(NH₃⁺)COO⁻ (2): 1726 ср. ν_{as,s}(C=O); 1602 уш. ν_{as}(COO); 1394 уш. ν_s(COO); 1518 ср. δ(NH₃⁺); 1308 с. δ(CH,CH₂); 1258 с., 1219 ср. ν_{as}(SO₂, SO₃).

¹H ЯМР (D₂O, 298 K) (pH=3) δ 3.36 (дд, 1H, CHH), 3.57 (дд, 1H, CHH), 4.16 (дд, 1H, CH₂CHCOOH). ¹³C{¹H} NMR (D₂O, 298 K) δ 50.39 (C^{1'}), 51.37 (C²), 171.65 (C³)[14].

Получение L-цистеинсульфоновой кислоты в виде иона



Депротонированная форма L-цистеинсульфоновой кислоты 3 получена в качестве побочного продукта в реакции L-цистеина и Na₂S₂O₃ в водной среде в течение 48 часов.

ИК (KBr), см⁻¹(SO₃⁻)CH₂CH(NH₂)COO⁻ (3): 1717 ср. ν_{as,s}(C=O); 1610 уш. ν_{as}(COO); 1390 уш. ν_s(COO); 1507 ср. δ(NH₃⁺); 1306 ср. δ(CH,CH₂); 1255-1191 ср. ν_{as}(SO₂, SO₃).

^1H ЯМР (D_2O , 298 К) (SO_3^-) $\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ (**3**) (pH=10): δ 3.39 (дд, 1H, *CHH*), 3.56 (дд, 1H, *CHH*), 3.86 (дд, 1H, CH_2CHCOOH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 298 К) δ 49.25 (C^1), 50.45 (C^2), 169.80 (C^3).

Обсуждение результатов

Характеристики ЯМР ^1H и ^{13}C *L*-цистеинсульфоновой кислоты были изучены при pH=3 и pH=10.

В соответствии с теоретическими данными, полученными с помощью программы Marvin [23] было установлено, что в растворах, при pH=3 *L*-цистеинсульфоная кислота находится в виде молекулярного иона $\text{SO}_3^-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (**2**), а при pH=10 имеет место полностью депротонированная форма $\text{SO}_3^-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ (**3**).

В ходе анализа спектров ЯМР ^1H соединений **2** и **3** (табл. 1), было установлено, что химические сдвиги двух форм *L*-цистеинсульфоновой кислоты имеют существенные отличия. Так, наиболее значительное изменение в спектрах ЯМР ^1H претерпевал протон при *CH* группе (C_2) (табл. 1, рис.1).

В частности, при pH=3 протон *CH* группы находился при 4.49 м.д., а при pH=10 сдвигался в более сильное поле в область 3.86 м.д. Протоны метиленовой группы *CHH* также претерпевали некоторое смещение в спектрах ЯМР ^1H с изменением pH, но в меньшей степени (табл. 1) [26].

Таблица 1
Экспериментальные и теоретические значения ЯМР ^1H -*L*-цистеиновой кислоты в виде ионов **2** и **3** в зависимости от pH раствора

Кислотность среды		<i>CH</i>	$^2J_{\text{NH}}$ Гц	$^3J_{\text{NH}}$ Гц	<i>CHH</i>	$^2J_{\text{HH}}$ Гц	$^3J_{\text{HH}}$ Гц
2 (pH=3)	Эксп.	4.49 дд	10.4	2.5	3.36 дд 3.58 дд	15.0 15.1	10.5 3.4
	Теор. (ChemDraw Ultra)	4.40 дд	-	-	4.32 дд 4.40 дд	-	-
	Теор. (Marvin)	4.57 дд	-	-	3.11 дд 3.42 дд	-	-
	Теор. (ACD/Labs)	4.34 дд			3.34 дд 3.40 дд		
3 (pH=10)	Эксп.	3.86 дд	7.2	4.7	3.39 дд 3.56 дд	13.9 13.8	7.6 4.6
	Теор. (ChemDraw Ultra)	3.5 дд	-	-	3.84 дд 4.09 дд	-	-
	Теор. (Marvin)	4.29 дд	-	-	3.39 дд 3.70 дд	-	-
	Теор. (ACD/Labs)	3.67 дд			3.24 дд 3.38 дд		

Кроме того, в спектрах ЯМР ^1H наблюдалось изменение значений геминальных и вицинальных констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) *L*-цистеинсульфоновой кислоты в виде ионов **2** и **3** (табл. 1). Существенные изменения значений вицинальных КССВ $^3J_{\text{HH}}$ могут свидетельствовать об изменении конформации молекулярных ионов при изменении кислотности среды [27].

В соответствии с полученными экспериментальными спектрами ЯМР ^{13}C для частично протонированной формы *L*-цистеинсульфоновой кислоты **2** химические сдвиги C_1 и C_2 находились при 49.37 и 50.16 м.д. соответственно, а четвертичный атом углерода C_3 наблюдался при 169.80 м.д. (табл.2). Для полностью депротонированного иона **3** химические сдвиги углеродных атомов C_1 и C_2 соответствовали значениям 51.37 и 50.39 м.д., а четвертичный атом углерода C_3 наблюдался при 171.65 м.д. (табл.3, рис.1). Полученные характеристики ЯМР ^{13}C *L*-цистеинсульфоновой кислоты согласуются с литературными данными [20].

Таблица 2
Экспериментальные и теоретические значения ЯМР ^{13}C для формы **2** *L*-цистеиновой кислоты

	C_1	C_2	C_3
Эксп. (pH =3)	49.37	50.16	169.80
Теор. (ChemDrawUltra)	52.00	52.00	172.00
Теор. (Marvin)	44.53	50.57	169.55
Теор.(ACD/Labs)	53.42	54.45	175.24

Таблица 3
Экспериментальные и теоретические значения ^{13}C ЯМР депротонированной формы *L*-цистеиновой кислоты (**3**)

	C_1	C_2	C_3
Эксп. (pH =10)	51.37	50.39	171.38
Теор. (ChemDrawUltra)	60.80	54.00	178.40
Теор. (Marvin)	53.57	52.58	173.10
Теор.(ACD/Labs)	56.39	51.01	180.40

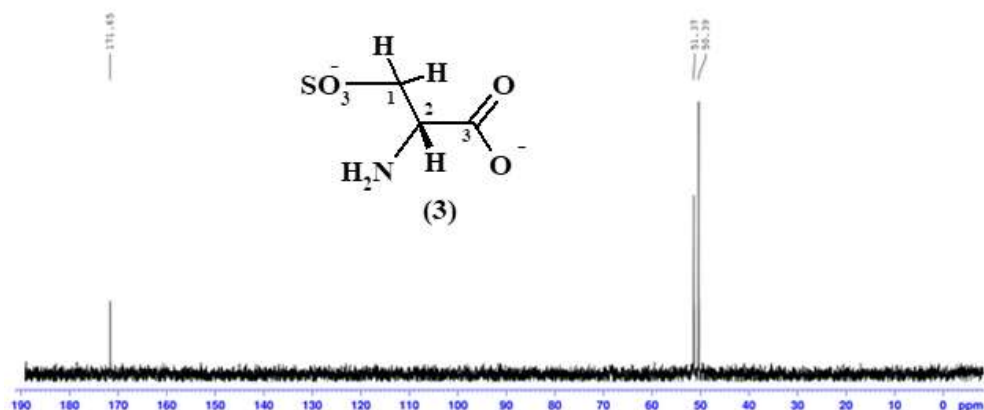


Рис. 1. Спектр ЯМР ^{13}C *L*-цистеинсульфоновой кислоты в виде иона **3**

Таким образом, в отличие от спектров ЯМР ^1H , в спектрах ЯМР ^{13}C не наблюдается сильного смещения химических сдвигов в зависимости от pH среды, что позволяет провести интерпретацию *L*-цистеинсульфоновой кислоты в растворе, что важно при исследовании механизмов реакций, протекающих с образованием подобных соединений [19].

Показано, что программы ChemDrawUltra [22], Marvin [23] и ACD/Labs [24] позволяют достаточно корректно описывать экспериментальные спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для ионов **2** и **3**, однако программа ACD/Labs несколько лучше описывает динамику протонов в спектрах ЯМР ^1H при изменении кислотности среды.

Спектры ЯМР зарегистрированы на оборудовании ЦКП «Химия» УФИХ РАН и РЦКП «Агидель» УФИЦ РАН. Анализ спектров выполнен в рамках темы государственного задания УФИХ РАН № АААА-А20-120012090029-0.

Список литературы:

1. Alcock L. J. Perkins M. V., Chalker J. M. Chemical methods for mapping cysteine oxidation // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V. 47. No. 1. P. 231–268.
2. Go, Y.-M., Jones, D. P. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. V. 50. No.4. P. 495–509.
3. Chung H. S., Wang S.-B., Venkatraman V., Murray C. I., Van Eyk, J. E. Cysteine Oxidative Posttranslational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System // *Circ. Res.* 2013. V. 112. No. 2. P. 382–392.
4. Tiwari B. K., Pandey K. B., Abidi A. B., Rizvi S. I. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus // *J Biomark.* 2013. V. 2013. P. 1–8.
5. Lin J., Lee I.-M., Song Y., Cook N. R., Selhub J., Manson J. E., Zhang S. M. Plasma Homocysteine and Cysteine and Risk of Breast Cancer in Women // *Cancer Res.* 2010. V. 70. No. 6. P. 2397–2405.

6. Bonifácio V. D. B., Pereira S. A., Serpa J., Vicente J. B. Cysteine metabolic circuitries: druggable targets in cancer // *Br. J. Cancer*. 2021. V. 124. P. 862-879.
7. Galván I., Ghanem, G., Møller A. P. Has removal of excess cysteine led to the evolution of pheomelanin? // *BioEssays*. 2012. V. 34. No.7. P. 565–568.
8. Hamann, M., Zhang, T., Hendrich, S., Thomas, J.A.: Quantitation of protein sulfinic and sulfonic acid, irreversibly oxidized protein cysteine sites in cellular proteins // *Meth. Enzymol.* 2002. V. 348. P. 146–156.
9. Lim J. C., Choi H.-I., Par Y. S., Nam H. W., Woo H. A., Kwon K.-S., Kim. Y. S., Rhee S. G., Kim K., Chae H. Z. Irreversible Oxidation of the Active-site Cysteine of Peroxiredoxin to Cysteine Sulfonic Acid for Enhanced Molecular Chaperone Activity// *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. No. 43. P. 28873–28880.
10. Nakamura K., Gonzales-Plasus M. M., Ushigusa-Ito T., Masuda R., Kabeya N., Kondo H., Hirono I., Satoh S., Haga Y. Taurine synthesis via the cysteic acid pathway: effect of dietary cysteic acid on growth, body taurine content, and gene expression of taurine-synthesizing enzymes, growth hormone, and insulin-like growth factor 1 in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* // *Fish. Sci.* 2021. V. 87. No. 3. P. 353–363.
11. Kiss R., Zhu M., Jójárt B., Czajlik A., Solti K., Fórizs B., Nagy E., Zsila F., Beke-Somfai T., Tóth G. Structural features of human DJ-1 in distinct Cys106 oxidative states and their relevance to its loss of function in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2017. V. 1861. No. 11. P. 2619–2629.
12. Khan A., Choi Y., Back J. H., Lee S., Jee S. H., Park Y. H. High-resolution metabolomics study revealing L-homocysteine Sulfinic acid, Cysteic acid, and Carnitine as novel biomarkers for high acute myocardial infarction risk // *Metab. Clin. Exp.* 2019. V. 104. P.1-13.
13. Berestova T. V., Kuzina L. G., Amineva N. A., Faizrakhmanov I. S., Massalimov I. A., Mustafin A. G. ATR-FTIR spectroscopic investigation of the cis- and trans- bis-(α -amino acids) copper(II) complexes. // *J. Mol. Struct.* 2017. Vol. 1137. Pp. 260–266.
14. Berestova T. V., Khursan S. L., Mustafin A. G. Experimental and theoretical substantiation of differences of geometric isomers of copper(II) α -amino acid chelates in ATR-FTIR spectra. // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2020. V. 229. 117950.
15. Berestova T. V., Gizatov R. R., Galimov M. N., Mustafin A. G. Influence of the absolute configuration of the ligand's chiral center on the structure of planar-square phenyl-containing bis-(N,O)copper(II) chelates. // *J. Mol. Struct.* 2021. V.1236, 130303.
16. Berestova, T.V., Nosenko, K.N., Lusina, O.V., Kuzina L.G., Kulish E.I., Mustafin A.G. Estimating the stability of metal–ligand bonding in carboxyl-containing polymer complexes by IR spectroscopy. // *J. Struct. Chem.* 2020. V. 61. P. 76–1887.
17. Берестова Т.В., Низаметдинова Л.А., Лусина О.В., Мустафин А.Г. Окисление L-цистеина в присутствии солей переходных металлов. // *Вестник Башкирск. ун-та*. 2020. Т. 25. No 2. С. 297-301

18. Берестова Т.В., Низаметдинова Л.А., Лусина О.В., Мустафин А.Г. Способ получения L-цистина из депротонированного L-цистеина. 2021. RU 2743344.
19. Берестова Т.В., Низаметдинова Л.А., Лусина О.В., Лобов А.Н., Мустафин А.Г. Анализ продуктов реакции L-цистеина с соединениями Fe(III) в кислой среде // Журнал прикладной спектроскопии. 2022. Т.89. № 1. С. 18-23.
20. AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS. URL: https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi
21. Pem B., Toma M., Vrček V., Vinković Vrček, I. Combined NMR and Computational Study of Cysteine Oxidation during Nucleation of Metallic Clusters in Biological Systems // Inorg. Chem. 2021. V. 60. No. 6. P. 4144–4161. URL: <https://perkinelmerinformatics.com/products/research/chemdraw/>
22. Marvin. ChemAxon. URL: <https://chemaxon.com/products/marvin>
23. Pagenkopf B. ACD/HNMR predictor and ACD/CNMR predictor // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127(9). P.3232.
24. Emiliozzi R., Pichat L. Méthode simple de préparation d'acide L(+)-amino-2-sulfino-3-propionique (acide cystéine sulfinique) // Bull. Soc. Chim. Fr. 1959. V. 49. No. 12. P. 1887-1888.
25. Darkwa J., Olojo R., Chikwana E., Simoyi R. H. Antioxidant Chemistry: Oxidation of L-Cysteine and Its Metabolites by Chlorite and Chlorine Dioxide. J. Phys. Chem. 2004. V.108. No 26. P. 5576–5587.
26. Farès C., Lingnau J. B., Wirtz C., Sternberg U. Conformational Investigations in Flexible Molecules Using Orientational NMR Constraints in Combination with 3J-Couplings and NOE Distances. // Molecules. 2019. V. 24. 4417.

Об авторах:

ЛУСИНА Ольга Валерьевна – студентка магистратуры 2 года обучения, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32); e-mail: lysinaolga24@gmail.com

БЕРЕСТОВА Татьяна Вячеславовна – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии и химической экологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32); e-mail: berestovatv@gmail.com

КУЗИНА Людмила Георгиевна – кандидат химических наук, доцент кафедры физической химии и химической экологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32); e-mail: kuzinalg@gmail.com

ЛОБОВ Александр Николаевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник группы ЯМР спектроскопии лаборатории физико-химических методов анализа ФГБНУ «Уфимский институт химии УФИЦ РАН» (450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр-кт Октября, д. 71); e-mail: lobovan@anrb.ru

МУСТАФИН Ахат Газизьянович – доктор химических наук, профессор кафедры физической химии и химической экологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» ((450076, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. Заки Валиди, д. 32); Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией Органических функциональных материалов «Уфимский института химии УФИЦ РАН», (450054, Республика Башкортостан, г. Уфа, пр-кт Октября, д. 71), e-mail: agmustafin@gmail.com

THE SPECTRAL CHARACTERISTICS OF THE L-CYSTEINE SULFONIC ACID

O.V. Lusina¹, T.V. Berestova¹, L.G. Kuzina¹,
A.N. Lobov², A.G. Mustafin¹

¹Bashkir State University, Ufa

²Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Center of RAS, Ufa

The theoretical and experimental spectral characteristics of the ions of protonated $(\text{SO}_3^-)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_3^+)\text{COO}^-$ (pH=3) and of deprotonated form of the *L*-cysteine sulfonic acid $(\text{SO}_3^-)\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COO}^-$ (pH=10) in the solutions were studied. Research carried out by methods ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy using theoretical calculations (ChemDraw Ultra, Marvin, ACD/Labs programs).

It was found that, in contrast to the ^1H NMR spectra, there is no strong shift of the chemical shifts relative to each other in the ^{13}C NMR spectra depending on the pH of the medium, which makes it possible to interpret *L*-cysteine sulfonic acid in solution by ^{13}C NMR spectroscopy.

Keywords: *L*-cysteine sulfonic acid, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, ChemDraw Ultra program, Marvin program, ACD/Labs program.