

АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ L-ЦИСТЕИНА С СОЕДИНЕНИЯМИ Fe(III) В КИСЛОЙ СРЕДЕ

Т. В. Берестова^{1*}, Л. А. Низаметдинова¹, О. В. Лусина¹,
А. Н. Лобов², А. Г. Мустафин^{1,2}

УДК 661.235.2:544.174.3

<https://doi.org/10.47612/0514-7506-2022-89-1-24-29>

¹ Башкирский государственный университет, Уфа, Башкортостан, Россия;
e-mail: berestovatv@gmail.com

² Уфимский институт химии УФИЦ РАН, Уфа, Башкортостан, Россия

(Поступила 11 ноября 2021)

Изучено взаимодействие раствора L-цистеина с соединениями железа(III) $FeCl_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $Fe(NO_3)_3$ в кислой среде (рН 2). Показано, что реакция проходит в течение 30 мин с образованием L-цистина (21–40 %) в качестве основного продукта. Установлено, что реакция L-цистеина с $FeCl_3$ приводит к образованию в растворе L-цистеинсульфоновой кислоты в качестве побочного продукта. Интерпретация продуктов реакции L-цистеина с соединениями Fe(III) проведена методами ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Ключевые слова: окисление L-цистеина, L-цистин, L-цистеинсульфоновая кислота, ИК-спектроскопия, ЯМР-спектроскопия.

The interaction of the L-cysteine solution with iron(III) compounds of $FeCl_3$, $Fe_2(SO_4)_3$, $Fe(NO_3)_3$ was studied in an acidic medium (pH 2). It was shown that the reaction proceeded 30 minutes with the formation of L-cystine (21–40%) as the main product. It was found that the L-cysteine reaction with $FeCl_3$ leads to the formation of the L-cysteine sulfinic acid in the solution as a by-product. The products of the L-cysteine reaction with Fe(III) compounds were interpreted by IR and NMR spectroscopy.

Keywords: oxidation of L-cysteine, L-cystine, L-cysteine sulfonic acid, IR-spectroscopy, NMR-spectroscopy.

Введение. Обратимое превращение биологически активных тиолов в дисульфиды — один из наиболее важных процессов, протекающих в организме и играющих важную роль в сигнальных процессах [1], денатурации белка [2], расщеплении ДНК [3] и окислительно-восстановительном гомеостазе [4]. В фармацевтической промышленности биологически активные тиолы применяются в качестве антиоксидантов [5].

Известно, что на ход окисления тиолов существенно влияет уровень рН реакционной среды. В зависимости от рН в качестве продуктов окисления L-цистеина наряду с L-цистином могут быть получены L-цистеинсульфеновая, L-цистеинсульфиновая и L-цистеинсульфоновая кислоты или их производные [6–11]. Наибольшей стабильностью среди указанных сульфокислот обладает L-цистеинсульфоновая кислота, которая выделена в индивидуальном виде и охарактеризована методами ЯМР [12, 13] и ИК-спектроскопии [13]. Известно [14], что L-цистеинсульфоновая кислота является наиболее окисленной формой L-цистеина ($pK_a < 2$). L-цистеинсульфоновая кислота и ее производные широко применяются в органическом синтезе и фармацевтической промышленности для лечения кожных заболеваний [15], в косметической отрасли как химический агент для краски волос [16].

ANALYSIS OF THE PRODUCTS OF THE L-CYSTEINE REACTION WITH Fe(III) COMPOUNDS IN AN ACIDIC MEDIUM

T. V. Berestova^{1*}, L. A. Nizametdinova¹, O. V. Lusina¹, A. N. Lobov², A. G. Mustafin^{1,2} (¹ Bashkir State University, Ufa, Bashkortostan, Russia; e-mail: berestovatv@gmail.com; ² Ufa Institute of Chemistry UFRS of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, Russia)

В качестве окислительных реагентов биологически активных тиолов часто используют классические неорганические соли, такие как KMnO_4 [17], FeCl_3 [18], CuCl_2 [19, 20], соли Ni(II) и Co(II) [21].

В настоящее время механизм окисления биологически активных тиолов в присутствии соединений переходных металлов является предметом активного изучения [22—26]. В качестве методов исследования реакций с участием аминокислот и их производных наряду с ЯМР-спектроскопией и хроматомасс-спектрометрией часто применяют ИК-спектроскопию, так как с ее помощью можно получить дополнительную информацию о структурных характеристиках подобных соединений [27—34]. Это обусловлено чувствительностью характеристических частот в средневолновой области ИК-спектра [32]. Ранее было показано [35, 36], что взаимодействие растворов *L*-цистеина с Cu(II) или Fe(III) в щелочной среде приводит к образованию *L*-цистина с высоким выходом.

В настоящей работе проведено детальное исследование продуктов реакции окисления *L*-цистеина при участии солей Fe(III) в кислой среде (pH 2), образованию которой способствует гидролиз вступающих в реакцию соединений.

Эксперимент. Использованы аминокислоты *L*-цистеин и *L*-цистин (99 % для синтеза, AppliChem Panreas ITW Co.). Растворы FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ готовили из соответствующих кристаллогидратов $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (“Авилон-компанихим”, квалификации “ч.д.а.”, Россия) по стандартным методикам. Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду.

Твердые образцы полученных аддуктов анализировали методом ИК-Фурье-спектроскопии (таблетки KBr), которые готовили по стандартной процедуре или методу нарушенного полного внутреннего отражения (приставка PIKE, США). ИК-спектры поглощения зарегистрированы в диапазоне $450\text{—}3700\text{ см}^{-1}$ с помощью Фурье-спектрометра FTIR-8400S (Shimadzu, Япония) при комнатной температуре, разрешение 4 см^{-1} , количество сканирований 20. Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C зарегистрированы на импульсном ЯМР-спектрометре Bruker Avance-III 500 МГц (500.13 МГц (^1H), 125.75 МГц (^{13}C)). Одно- и двумерные ЯМР-спектры ($\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ COSY, $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ HSQC, $\{^1\text{H}, ^{13}\text{C}\}$ HMBC, $\{^1\text{H}, ^1\text{H}\}$ NOESY) зарегистрированы по стандартным процедурам.

Реакция окисления L-цистеина в присутствии соединений Fe(III). В колбу объемом 100 мл, установленную на магнитной мешалке, помещали 0.2 г (1.65 ммоль) *L*-цистеина в 10 мл дистиллированной воды при комнатной температуре, затем добавляли 2—25 мл раствора, содержащего 0.45—0.67 г (1.65 ммоль) соли ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Реакцию проводили при температуре 25°C при непрерывном перемешивании в течение 5—10 мин до появления взвеси белого цвета. После формирования осадка полученный продукт дважды промывали на фильтре водой. Получали мелкокристаллический порошок белого цвета с выходом 21—40 %. Полученную твердую фракцию промывали дистиллированной водой и высушенный фильтрат анализировали методами ИК- и ЯМР-спектроскопии. Белый твердый осадок представлял собой *L*-цистин (**1**) [36]. В некоторых случаях в упаренном фильтрате наблюдали образование *L*-цистеинсульфоновой кислоты (**2**) [8, 13] (табл. 1).

ИК (KBr), см^{-1} (*L*-цистин) (**1**): 2718–3233 ср. $\nu_{\text{as,s}}(\text{CH})$; 1621 ср., 1584 ср. $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$; 1487 ср. $\delta(\text{NH}_3^+)$; 1408 ср., 1382 ср. $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$; 1337 ср., 1298 ср., 1192 ср. $\delta(\text{CH}_2\text{CH}_2)$. ^1H ЯМР (D_2O , 298 К) δ 3.08 (дд, $^2J = 14.0\text{ Гц}$, $^3J = 7.7\text{ Гц}$, 1H, CHN), 3.28 (дд, $^2J = 14.0\text{ Гц}$, $^3J = 4.5\text{ Гц}$, 1H, CHN), 3.83 (дд, $^3J = 7.7\text{ Гц}$, 1H, CH_2CHCOOH). ^{13}C ЯМР (D_2O , 298 К) δ 42.06 (C^1 , C^1), 54.61 (C^2 , C^2), 178.64 (C^3 , C^3).

ИК (KBr), см^{-1} (*L*-цистеинсульфоновая кислота) (**2**): 1726 ср. $\nu_{\text{as,s}}(\text{C=O})$; 1602 уш. $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$; 1394 уш. $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$; 1518 ср. $\delta(\text{NH}_3^+)$; 1308 ср. $\delta(\text{CH}_2\text{CH}_2)$; 1258 ср., 1219 ср. $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2, \text{SO}_3)$. ^1H ЯМР (D_2O , 298 К) δ 3.36 (дд, 1H, CHN), 3.57 (дд, 1H, CHN), 4.16 (дд, 1H, CH_2CHCOOH). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (D_2O , 298 К) δ 50.39 (C^1), 51.37 (C^2), 171.65 (C^3).

Т а б л и ц а 1. Условия и продукты реакции *L*-цистеина с участием солей Fe(III)

Соединение переходного металла $\text{Fe}_x(\text{KO})_3$	Выход <i>L</i> -цистина 1 , %	Содержание <i>L</i> -цистеинсульфоновой кислоты 2 в растворе
FeCl_3	21	++
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	32	–
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	40	следы

Результаты и их обсуждение. *Взаимодействие L-цистеина с соединениями Fe(III).* Установлено, что направление реакции *L*-цистеина с соединениями Fe(III) до основного продукта **1** при pH 2 определяется природой вовлекаемого в реакцию соединения Fe(III) , а именно природой аниона (табл. 1).

Взаимодействие *L*-цистеина с соединениями, содержащими в своем составе ионы Fe(III) в соотношении 1:1, при 25 °С проходит в течение 30 мин. Наибольший выход *L*-цистина составляет 40 % и достигается при участии Fe(NO₃)₃ (схема 1, табл. 1).

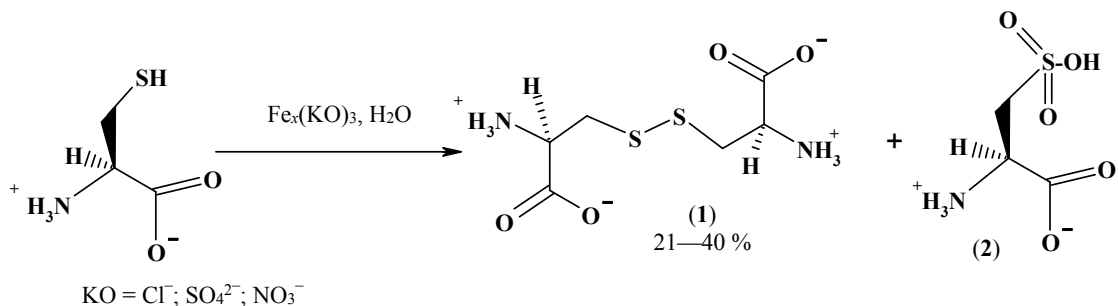


Схема 1. Продукты реакции *L*-цистеина с соединениями Fe(III)

В кислой среде, создаваемой легко гидролизующимися по катиону солями железа, инициатором окисления могут выступать ионы Fe(III). В этом случае интермедиатами реакции являются промежуточные металлокомплексы, которые последовательно окисляют *L*-цистеин до *L*-цистина и/или *L*-цистеинсульфоновой кислоты (схема 2).

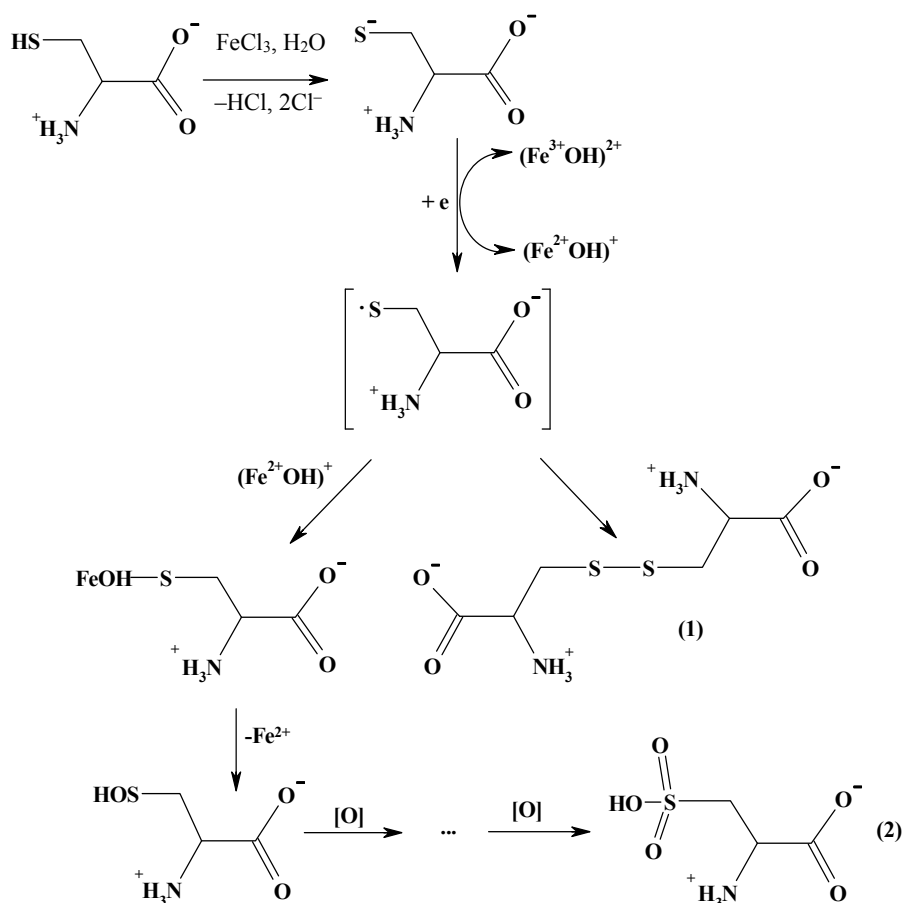


Схема 2. Предполагаемый механизм окисления *L*-цистеина в присутствии FeCl₃

Образование *L*-цистина **1** в качестве основного продукта зависит от скорости образования промежуточных комплексных соединений исходного *L*-цистеина с переходным металлом [21].

Интерпретация продуктов окисления L-цистеина. Методами ИК- и ЯМР-спектроскопии образующихся в ходе реакции соединений установлено, что окисление *L*-цистеина в присутствии солей

переходных металлов осуществляется преимущественно с образованием *L*-цистина **1** (рис. 1) [36], что согласуется с данными [37, 38]. Структура полученного в ходе реакции *L*-цистина доказана также с применением одно- и двумерных методов ЯМР-спектроскопии.

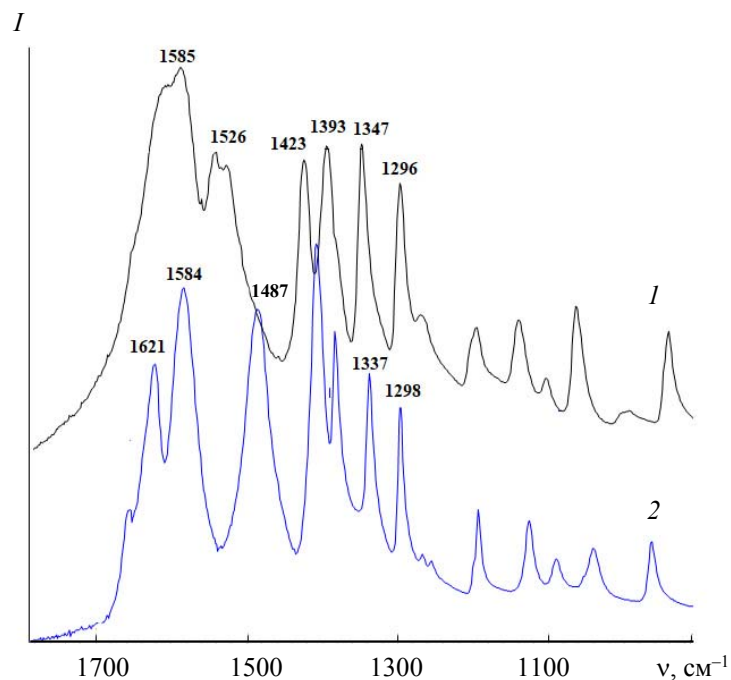


Рис. 1. Характеристические частоты *L*-цистеина (1) и *L*-цистина **1** (2) в средневолновой области ИК-спектра

Установлено, что в качестве побочного продукта окисления *L*-цистеина в реакции с FeCl₃ образуется *L*-цистеинсульфоновая кислота [8, 13]. Интерпретация полученного соединения проведена методами ЯМР- и ИК спектроскопии (рис. 2, 3).

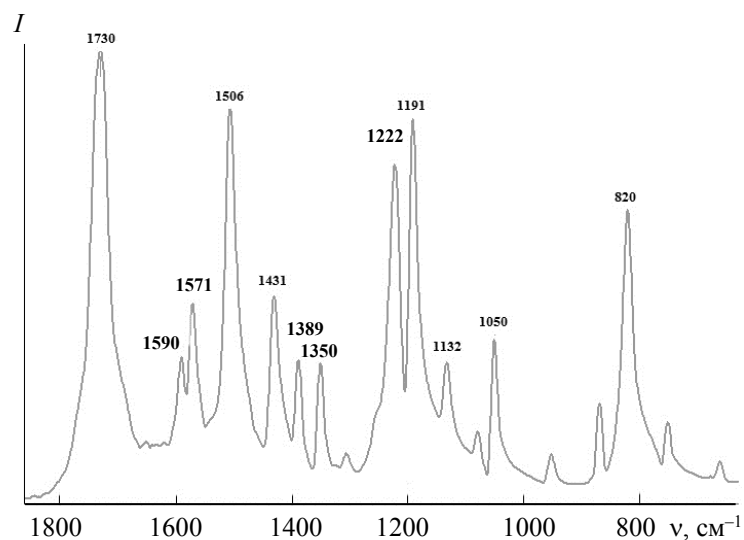


Рис. 2. Характеристические частоты *L*-цистеинсульфоновой кислоты (2) в средневолновой области ИК-спектра

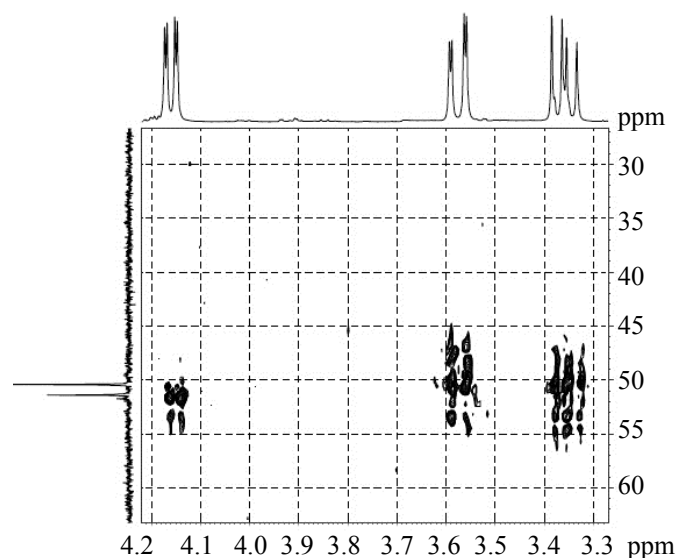


Рис. 3. Спектр HSQC *L*-цистеинсульфоновой кислоты (**2**)

В ИК-спектрах соединения **2** наблюдается асимметричное валентное колебание карбоксильной группы $\nu_{as,s}(C=O)$ в области 1730 см^{-1} , что свидетельствует о протонировании соединения **2** при pH 2. Полоса поглощения асимметричных и симметричных валентных колебаний $\nu_{as,s}(C-O)$ в области 1431 см^{-1} также соответствует протонированной форме **2**. Деформационные колебания протонированной аминогруппы $\delta(NH_3^+)$ расположены в области 1506 см^{-1} . ИК-характеристики *L*-цистеинсульфоновой кислоты хорошо согласуются с литературными данными, полученными для молекулярного иона $[cysSO_3]^-$ [6].

Исследование соединения **2** кислоты проведено также методом ЯМР-спектроскопии в D_2O с применением двумерных методик (1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, NOESY, COSY HH) (рис. 3). В спектрах ЯМР 1H появляется двойной набор дублетов при 3.36 и 3.57 м.д., характеризующих два протона H_A и H_B при сульфогруппе, и дублет дублетов при 4.16 м.д. при асимметричном атоме углерода. В соответствии с данными [8] полученное соединение отнесено к *L*-цистеинсульфоновой кислоте. Спектр ЯМР ^{13}C также соответствует соединению **2** по описанным в [12, 13] значениям.

Заключение. Изучено взаимодействие соединений Fe(III) *L*-цистеином при pH 2. Установлено, что реакция осуществляется с образованием *L*-цистина в качестве основного продукта с выходом 21—40%. Применение в качестве реагента $FeCl_3$ приводит к появлению побочного продукта — *L*-цистеинсульфоновой кислоты, которая интерпретирована методами ЯМР- и ИК-спектроскопии.

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.

- [1] K. Ulrich, U. Jakob. Free Radic. Biol. Med., **140** (2019) 14—27
- [2] H. F. Gilbert. Methods Enzymol., **251** (1995) 8—28
- [3] J. Golik, J. Clardy, G. Dubay, G. Groeneveld, H. Kawagushi, M. Konishi, H. Ohkuma, Saitoh, T. W. Doyle. J. Am. Chem. Soc., **109** (1987) 3462—3464
- [4] L. I. Leichert, F. Gehrke, H. V. Gudiseva, T. Blackwell, M. Ilbert, A. K. Walker, J. R. Strahler, P. C. Andrews, U. Jakob. Proc. Natl. Acad. Sci., **105**, N 24 (2008) 8197—8202
- [5] O. I. Aruoma, B. Halliwell, B. M. Hoey, J. Butler. Free Radical Biol. Med., **6**, N 6 (1989) 593—597
- [6] D. Scuderi, E. Bodo, B. Chiavarino, S. Fornarini, M. E. Crestoni. Chem. Eur. J., **22** (2016) 1—13
- [7] J.-P. R. Chauvin, D. A. Pratt. Angew. Chem. Int. Ed., **56** (2017) 6255—6259
- [8] J. Darkwa, R. Olojo, E. Chikwana, R. H. Simoyi. J. Phys. Chem., **108** (2004) 5576—5587
- [9] L. B. Poole, K. J. Nelson. Curr. Opin. Chem. Biol., **12** (2008) 18—24
- [10] J. V. Cross, D. J. Templeton. Antiox. Redox Signal., **8**, N 9-10 (2006) 1819—1827
- [11] C. Jacob, E. Battaglia, T. Burkholz, D. Peng, D. Bagrel, M. Montenarh. Chem. Res. Toxicol., **25** (2012) 588—604

- [12] **K. Bahrami, M. M. Khodaei, J. Abbasi.** *Synthesis*, **44** (2012) 316—322
- [13] AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS, <https://sdb.sdb.aist.go.jp>
- [14] **L. J. Alcock, M. V. Perkins, J. M. Chalker.** *Chem. Soc. Rev.*, **47** (2018) 231—268
- [15] **F. B. Jariwala, R. E. Wood, U. Nishshanka, A. B. Attygalle.** *J. Mass Spectrom.*, **47** (2012) 529—538
- [16] **R. J. Yu, E. J. Vanscott.** Treatment of Body Odor and Disturbed Keratinization, US4053630 (A61K 031=315) 11 Oct 1977 (1977)
- [17] **A. Mustefa, D. Herbert.** Hair Dye Agents with at Least One Conditioner, WO9701323 (A61K7=13) 16 Jan 1997 (1997)
- [18] **N. A. Noureldin, M. Caldwell, J. Hendry, D. G. Lee.** *Synthesis*, **11** (1998) 1587—1589
- [19] **A. R. Ramesha, S. Chandrasekaran.** *J. Org. Chem.*, **59** (1994) 1354—1357
- [20] **L. Pecci, G. Montefoschi, G. Musci, D. Cavallini.** *Amino Acids*, **13** (1997) 355—367
- [21] **A. Rigo, A. Corazza, M. L. D. Paolo, M. Rossetto, R. Ugolini, M. Scarpa.** *J. Inorg. Biochem.*, **98** (2004) 1495—1501
- [22] **G. A. Bagiyani, I. K. Koroleva, N. V. Soroka, A. V. Ufimtsev.** *Russ. Chem. Bull.*, **52**, N 5 (2003) 1135—1141
- [23] **R. A. Zager, K. M. Burkhart.** *Kidney Int.*, **53** (1998) 1661—1672
- [24] **M. Ruetz, J. Kumutima, B. E. Lewis, M. R. Filipovic, N. Lehnert, T. L. Stemmler, R. Banerjee.** *J. Biol. Chem.*, **292**, N 16 (2017) 6512—6528
- [25] **M. R. Challand, E. Salvadori, R. C. Driesener, C. W. M. Kay, P. L. Roach, J. Spence.** *PLoS One*, **8**, N 7 (2013) 1—10
- [26] **B. Karami, M. Montazerzohori, M. Moghadam, M. H. Habibi, K. Niknam.** *Turk. J. Chem.*, **29** (2005) 539—546
- [27] **R. C. Smith, V. D. Reed, W. E. Hill.** *Phosphorus, Sulfur, Silicon*, **90** (1994) 147—154
- [28] **C. M. Jones, M. Bernier, E. Carson, K. E. Colyer, R. Metz, A. Pawlow, E. D. Wischow, I. Webb, E. J. Andriole, J. C. Poutsma.** *Int. J. Mass Spectrom.*, **267** (2007) 54—62
- [29] **Z. Tian, A. Pawlow, J. C. Poutsma, S. R. Kass.** *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 5403—5407
- [30] **Z. Tian, S. R. Kass.** *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (2008) 10842—10843
- [31] **J. Oomens, J. D. Steill, B. Redlich.** *J. Am. Chem. Soc.*, **131** (2009) 4310—4319
- [32] **T. V. Berestova, L. G. Kuzina, N. A. Amineva, I. S. Faizrakhmanov, I. A. Massalimov, A. G. Mustafin.** *J. Mol. Struct.*, **1137** (2017) 260—266
- [33] **T. V. Berestova, S. L. Khursan, A. G. Mustafin.** *Spectrochim. Acta A*, **229** (2020) 117950
- [34] **T. V. Berestova, R. R. Gizatov, M. N. Galimov, A. G. Mustafin.** *J. Mol. Struct.*, **1236** (2021) 130303
- [35] **Т. В. Берестова, Л. А. Низаметдинова, О. В. Лусина, А. Г. Мустафин.** *Вестн. Башкир. ун-та*, **25**, № 2 (2020) 297—301
- [36] **Т. В. Берестова, Л. А. Низаметдинова, О. В. Лусина, А. Г. Мустафин.** Способ получения L-цистина из депротонированного L-цистеина, патент на изобретение RU 2743344 (2021)
- [37] **H. Song, A. S. Her, F. Raso, Z. Zhen, Y. Huo, P. Liu.** *Org. Lett.*, **16** (2014) 2122—2125
- [38] **J. S. Church, D. J. Evans.** *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, **69** (2008) 256—262