ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2025, том 99, № 2, с. 324–330

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПРОЦЕССОВ РАЗДЕЛЕНИЯ. ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК: 543,544

ВВЕДЕНИЕ КАТИОНИРУЮЩИХ АГЕНТОВ В ПРОЦЕССАХ МЯГКОЙ ИОНИЗАЦИИ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ПЕПТИДОВ: ЛАЗЕРНАЯ ДЕСОРБЦИЯ И ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕ

© 2025 г. Е. С. Кузнецова[a], *, И. С. Пыцкий[a], А. К. Буряк[a]

[a]*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН, Москва, 119071, Россия*

** e-mail: eskuznetsova8@yandex.ru*

Поступила в редакцию 04.04.2024 г.
После доработки 04.04.2024 г.
Принята к публикации 18.04.2024 г.

В работе проведено масс-спектрометрическое исследование процессов ионизации коротких пептидов триглицина, аланилглутамина и пролиллейцина методами ионизации в электроспрее (ЭРИ) и поверхностно-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (ПАЛДИ) в присутствии кристаллогидрата сульфата меди. Показано, что при ионизации ЭРИ присутствие в растворе ионов меди инициирует агрегацию молекул пептидов с образованием крупных ассоциатов до 7–8 молекул пептида. Изучено влияние природы пептидов на характер процессов ионизации. В то же время, при ионизации методом ПАЛДИ происходит конкурентное катионирование молекул пептидов ионами меди с образованием иона M+Cu+. Также характерна фрагментация пептидов и катионирование медью продуктов декарбоксилирования.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, мягкие методы ионизации, кластерообразование, пептиды, аминокислоты, кластерный ион

DOI: 10.31857/S0044453725020199, **EDN:** DCWKVN

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время эффективно осваивают и применяют различные методы масс-спектрометрии для высокочувствительного анализа сложных составных объектов как естественного, так и техногенного происхождения. Вместе с тем масс-спектрометрия, согласно последним литературным данным, показывает высокую информативность при изучении ионизации и кластерообразования органических и неорганических соединений и в том числе их смесей в сочетании с хроматографическими методами разделения. В первую очередь для исследования ионизации применяют “мягкие” методы ионизации – поверхностно-активированная лазерная десорбция/ионизация (ПАЛДИ), электрораспылительная ионизация (ЭРИ), вторичноионная масс-спектрометрия (ВИМС) и бомбардировка быстрыми атомами (ББА). Ионизация указанными методами часто приводит к образованию фрагментных ионов и кластерных ассоциатов, что важно при исследовании интермедиатов в процессах ионизации и ее механизмов.

Важное место в жизнедеятельности организмов принадлежит аминокислотам, пептидам и белкам, которые активно участвуют в регуляции метаболических процессов. Многие из пептидов проявляют биологическую активность. Некоторые пептиды являются гормонами, например: трипептид глутатион, состоящий из остатков глицина, цистеина и глутаминовой кислоты, вазопрессин и окситоцин, состоящие из девяти аминокислотных остатков.

По размеру молекулы и своим свойствам пептиды стоят между высокомолекулярными белками и аминокислотами. Наиболее распространены линейные пептиды, встречаются также и циклические, молекулы которых имеют различные размеры. При исследовании имеющих важное биологическое значение аминокислот, пептидов и белков методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) различные авторы применяют разнообразные жидкие матрицы, сочетание жидкой матрицы и частиц графита, кремний, пористый графит, углеродные нанотрубки, активированный уголь, фуллерены [1–4].

Известны работы по исследованию процессов ионизации и идентификации пептидов, аминокислот и их смесей методами масс-спектрометрии [5, 6]. Авторами было показано, что при ионизации аминокислот методами ПАЛДИ и ЭРИ образуются

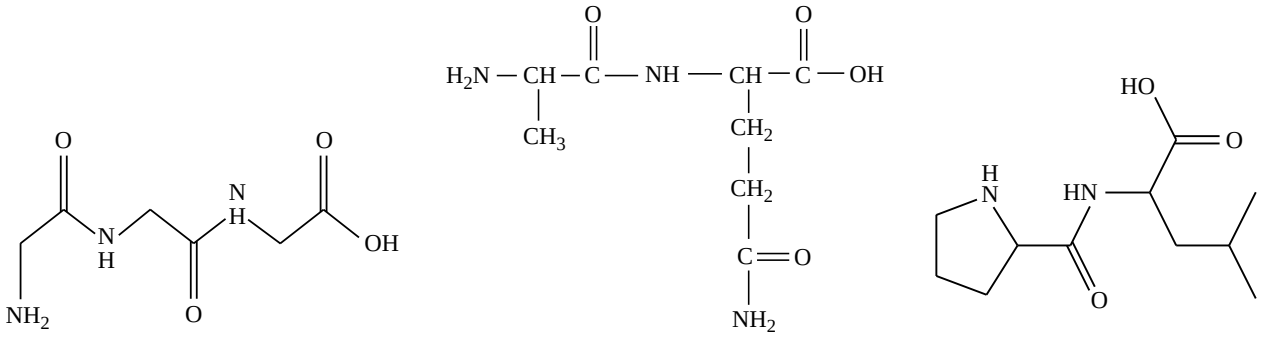

Рис. 1. Структурные формулы олигопептидов.

ассоциаты, и активность образования увеличивается в присутствии координирующих металлов [7, 8]. Установлено, что ряд кластерных ионов может быть довольно обширен и составлять ассоциаты до 10 молекул аминокислот.

В ряде исследований [9, 10] проанализированы взаимодействия пептидов и ионов двухвалентных металлов Cu и Zn методами ПАЛДИ и ЭРИ.

Короткоцепочечные пептиды имеют замечательное свойство образовывать в растворах хелатные комплексы с четырехкоординационными металлами. В этой работе изучены процессы кластерообразования короткоцепочечных пептидов триглицина 3Gly, аланилглутамина Ala-Gln и пролиллейцина Pro-Leu в присутствии солей Cu методами мягкой ионизации ПАЛДИ и электрораспылительной ионизацией (ЭРИ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оборудование и методы исследования

Эксперимент проводили, используя времяпролетный масс-спектрометр Bruker Daltonics UltraFlex с источником лазерной десорбции/ионизации, фотоинициирование производили азотным лазером с длиной волны 337 нм. Масс-спектры снимали в режиме регистрации положительных ионов, выталкивающее напряжение 25 кВ, доускоряющее напряжение – 18 кВ.

Для исследования кластерообразования методом электрораспыления использовали масс-спектрометр Bruker Maxis Impact с системой масс-анализаторов Q-TOF. 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. Пептиды, использованные в работе, фирмы “Sigma” (США) – триглицин, аланилглутамин, пролиллейцин. Чистота соединений составляет ≥ 98%.

К растворам пептидов 3Gly (Mr = 189 Да), Ala-Gln (Mr = 217 Да) и Pro-Leu (Mr = 228 Да) в концентрации 0.4 мг/мл ацетонитрил/вода добавляли раствор соли CuSO4·8H2O в концентрации 40 мг в 10 мл. Затем полученные растворы анализировали методами ПАЛДИ и ЭРИ. Для идентификации соединений методом ПАЛДИ определяли массу иона, а его изотопное распределение сравнивали с теоретическим с использованием программы-симулятора IsotopePattern (Bruker Inc.). Дополнительно применяли метод псевдо-двумерной масс-спектрометрии метастабильного распада (LIFT). Для идентификации соединений методом ЭРИ подбирали брутто-формулы по точной массе иона и фрагментировали молекулы методом тандемной масс-спектрометрии для восстановления структуры по осколочным ионам.

В качестве объектов исследования были выбраны олигопептиды, состоящие из двух и трех аминокислотных остатков (рис. 1). Эти пептиды имеют различную природу и структуру – линейные (триглицин), содержащие аминокислотный остаток с пятичленным циклом (пролиллейцин) и линейный пептид с двумя аминогруппами. Как видно из рисунка, несмотря на общее наличие C-N-связей, характерных для пептидов, выбранные соединения имеют различную структуру, способность к ионизации и фрагментации. Наличие свободных амино- и карбоксильных групп определяет их двойственную природу ионизации, что значительно разнообразит направления фрагментации и кластерообразования. Эти соединения выбраны из-за разности длин углеродных цепей и наличия аминогрупп с различной гибридизацией азота (в триглицине один азот первичный и два вторичных, в аланилглутамине – один вторичный и два первичных, в пролиллейцине – два вторичных, причем один циклический). Кроме этого, два последних пептида имеют разветвленную углеродную цепь, что также сказывается на разнообразии путей ионизации.

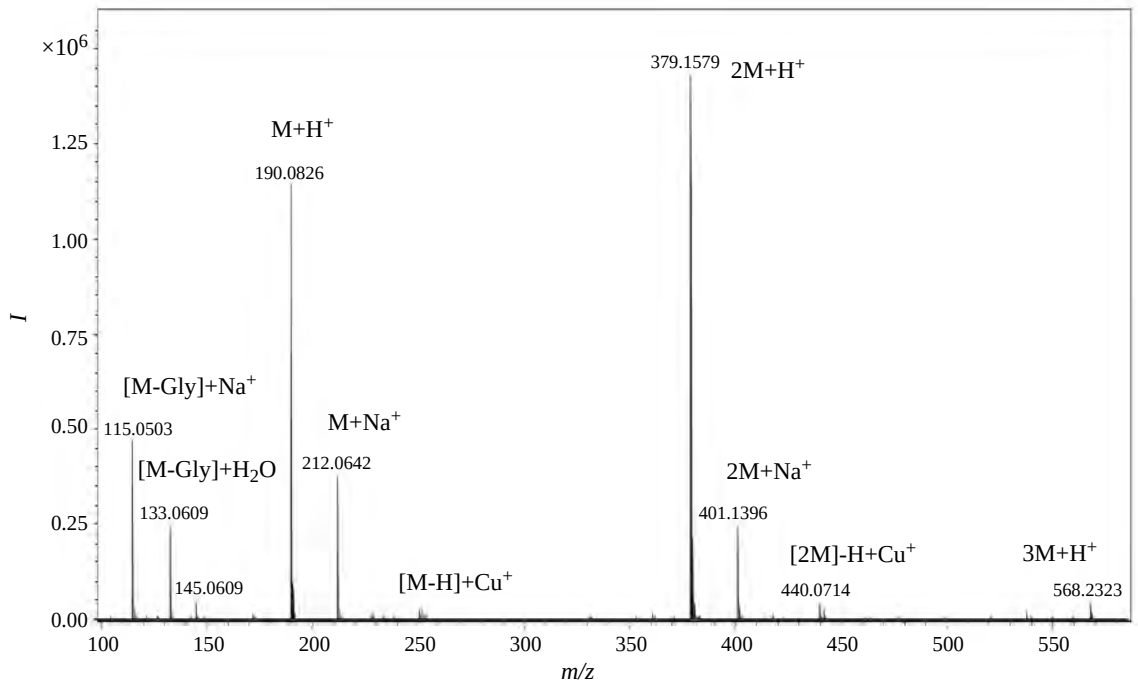

Рис. 2. Масс-спектр ЭРИ триглицина с добавлением раствора соли $CuSO4{\cdot}8H_2O$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе получены масс-спектры пептидов в присутствии солей меди Cu и проведена идентификация основных кластерных ионов в обоих методах ионизации.

В работе продемонстрировано, что при введении солей меди происходит вытеснение протонов и заряженных частиц из структуры молекул, с замещением их атомами металла. При использовании метода ЭРИ образуется широкий ряд кластеров различного состава. На рис. 2 приведен масс-спектр ЭРИ линейного трипептида – триглицина с добавлением солей Cu. Как известно, медь образует хелатные комплексы с аминокислотами и пептидами. На рисунке видно характерное кластерообразование. В полученном масс-спектре обнаружены молекулярный ион $M + H^+$ (с массой 190 Да), ион аддукта пептида с щелочными металлами $M^+ + Na$ (с массой 212 Да) и кластерные ионы $M + Cu^+$, кластерный ион димера $[2M]-H + Cu^+$ (с массой 440 Да). Кроме того, в процессе ионизации происходит фрагментация иона пептида с образованием кластерного иона $[M-Gly]+H^+$ (с массой 115 Да). При этом образование иона 133 Да свидетельствует о том, что распад глицина происходит по карбоксильной группе с образованием C=O-конца. Ион 133 Да является продуктом гидролиза C=O-конца. Из масс-спектра видно, что одним из основных ионов в масс-спектре является димер $2M+H^+$ (379 Да), что указывает на наибольшую стабильность такой конфигурации в растворе за счет образования водородных связей. При этом также стабильна конфигурация натрий-замещенных аддуктов, что явно указывает на возможность использования натриевых солей для усиления ионизации пептидов при мониторинге. Образование тримера пептида $3M+H^+$ в значительной степени подавлено из-за большой подвижности его молекул и, как следствие, стерических затруднений при образовании заряженного кластера. Данное предположение подтверждается отсутствием аддукта тримера с натрием из-за его большей (по сравнению с протоном) величины. В целом масс-спектр практически полностью повторяет масс-спектр чистого пептида без добавления соли меди. В масс-спектре обнаружены аддукты с медью $[2M]-H+Cu^+$ (440 Да) с интенсивностью не более 4% от протонированного иона димера и такой же интенсивности ион $[M-H]+Cu^+$ (с массой 251 Да). Следует отметить, что линейная структура молекулы и отсутствие сопряженных связей практически не позволяет координироваться вокруг крупных заряженных центров, а при наличии в подвижной фазе большого количества ионов натрия происходит конкурентное катионирование ими молекул пептида, что значительно снижает вероятность образования кластерных соединений с ионами меди.

В масс-спектре пептида аланилглутамина с добавлением солей Cu (рис. 3) доминирует молекулярный ион $M + H^+$ (с массой 218 Да), но в то же время присутствуют кластерные ионы $M + Cu^+$

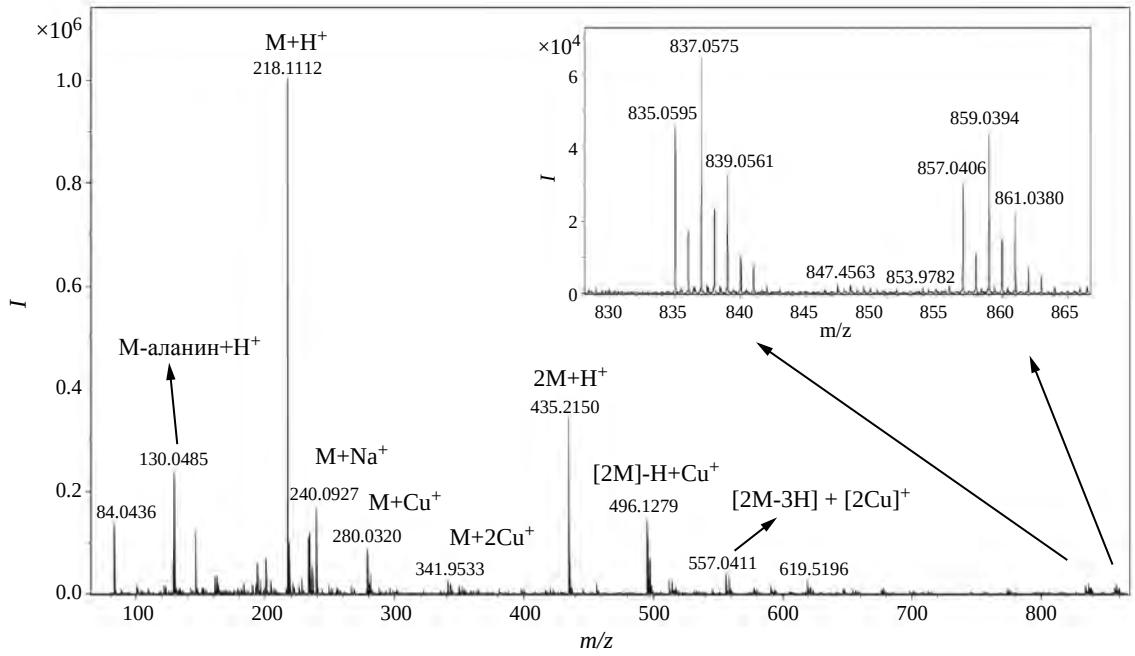

Рис. 3. Масс-спектр ЭРИ аланилглутамина с добавлением раствора соли $CuSO4{\cdot}8H_2O$.

(с массой 280 Да), кластерный ион димера $2M + H^+$ (с массой 435 Да) и его аддукт с медью $[2M]\text{-}H + Cu^+$. Из полученных данных видно, что для пептида аланилглутамина в присутствии солей Cu характерно образование больших кластерных ионов димеров и тримеров пептида с атомом меди в качестве заряженного центра: $[2M\text{-}3H] + [2Cu]^+$ (с массой 557 Да), $[3M\text{-}3H] + [3Cu]^+$ (с массой 837 Да), $[3M\text{-}3H] + [3Cu + Na]^+$ (с массой 859 Да). Следует отметить, что в случае образования димеров с атомами меди происходит уход из молекул пептидов кислых протонов, причем в случае с аланилглутамином количество уходящих протонов превышает количество кислых в ассоциированных молекулах (557 Да) – димер с двумя атомами меди. Объяснение такого явления кроется, предположительно, в образовании ковалентных связей меди с образующимися анионными группами и подтверждает потенциальную возможность образования хелатных комплексов пептидов с атомами меди.

На рис. 4 приведен масс-спектр ЭРИ аланилглутамина с добавлением солей Cu с характерным молекулярным распределением кластерных ионов димера и тримера пептида с ионами Cu.

На рис. 5 представлен масс-спектр ЭРИ пролиллейцина с добавлением сульфата меди. В масс-спектре присутствуют молекулярный ион $M + H^+$ (с массой 229 Да), кластерный ион $M + Cu^+$ (с массой 291 Да), кластерный ион димера $2M^+ + Cu$, а также образуются кластерные ионы типа $[M^+ + Cu^+]_n$ Основным пиком является протонированный ион пептида. В то же время, аддукты со щелочными металлами практически полностью замещены аддуктом пептида с медью, которая замещает заряженный протон (ион 291.073 Да). Характерна также агрегация в димерный кластер типа $2M + H^+$ (457.2180 Да). В отсутствие меди крайне трудно получить более крупные агрегаты из-за малого размера заряженного центра. В присутствии крупного атома меди это подтверждается наличием ионов 518.1311 Да ($M + (M\text{-}H) + Cu^+$), и 581.1279 Да ($M + (M + Cu\text{-}H^+) + Cu^+$). В обоих случаях медь является заряженным центром агрегации, а при присоединении нескольких атомов меди один становится заряженным центром, а второй встает на место вытесненного подвижного протона молекулы пептида. Далее начинается последовательное присоединение медной соли исследуемого пептида. Суммарное количество агрегированных молекул пептида вокруг одного атома меди достигает шести. Самый крупный кластерный ион имеет атомную массу более 2000 Да. Как видно из полученных данных, пролил-лейциновый пептид наиболее склонен к кластерообразованию с ионами меди из-за наличия в молекуле пролина вторичной аминогруппы, которая способна к комплексообразованию с атомами меди в сочетании с карбоксильной группой.

При исследовании процессов ионизации методом ПАЛДИ наиболее характерными компонентами ионного облака в вакууме являются кластеры сульфата меди, которые часто присутствуют в масс-спектрах пептидов и составляют основную группу пиков. Преимущественная кристаллизация

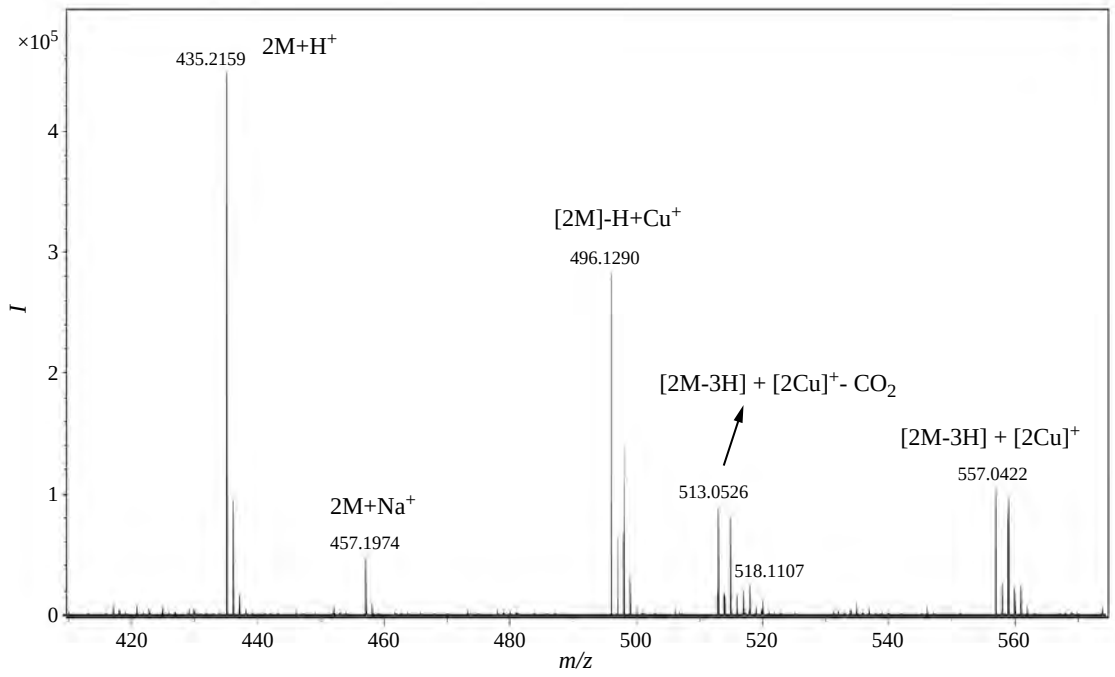

Рис. 4. Масс-спектр ЭРИ аланилглутамина в присутствии раствора соли $CuSO4{\cdot}8H_2O$ с кластерным распределением ионов.

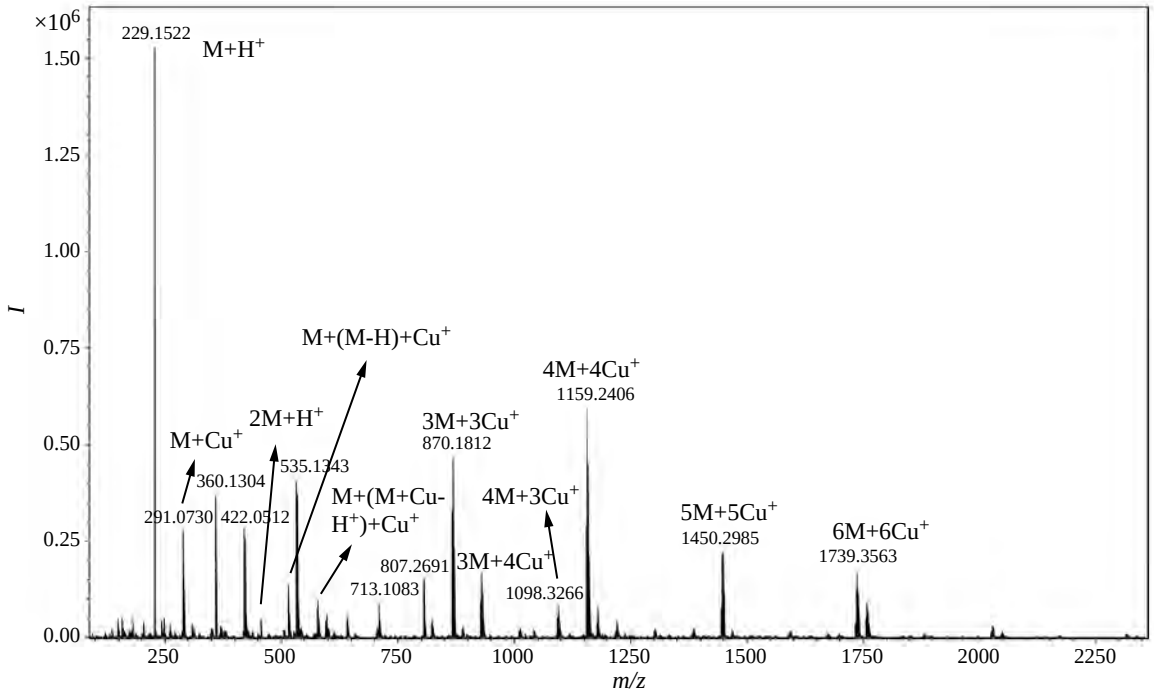

Рис. 5. Масс-спектр ЭРИ пролиллейцина с добавлением раствора соли $CuSO4{\cdot}8H_2O$.

сульфата меди на поверхности также снижает эффективность ионизации пептидов. На рис. 6 приведены масс-спектры ПАЛДИ триглицина, аланилглутамина и пролиллейцина в присутствии солей Cu. В масс-спектре триглицина обнаружены молекулярные ионы в виде солей Na

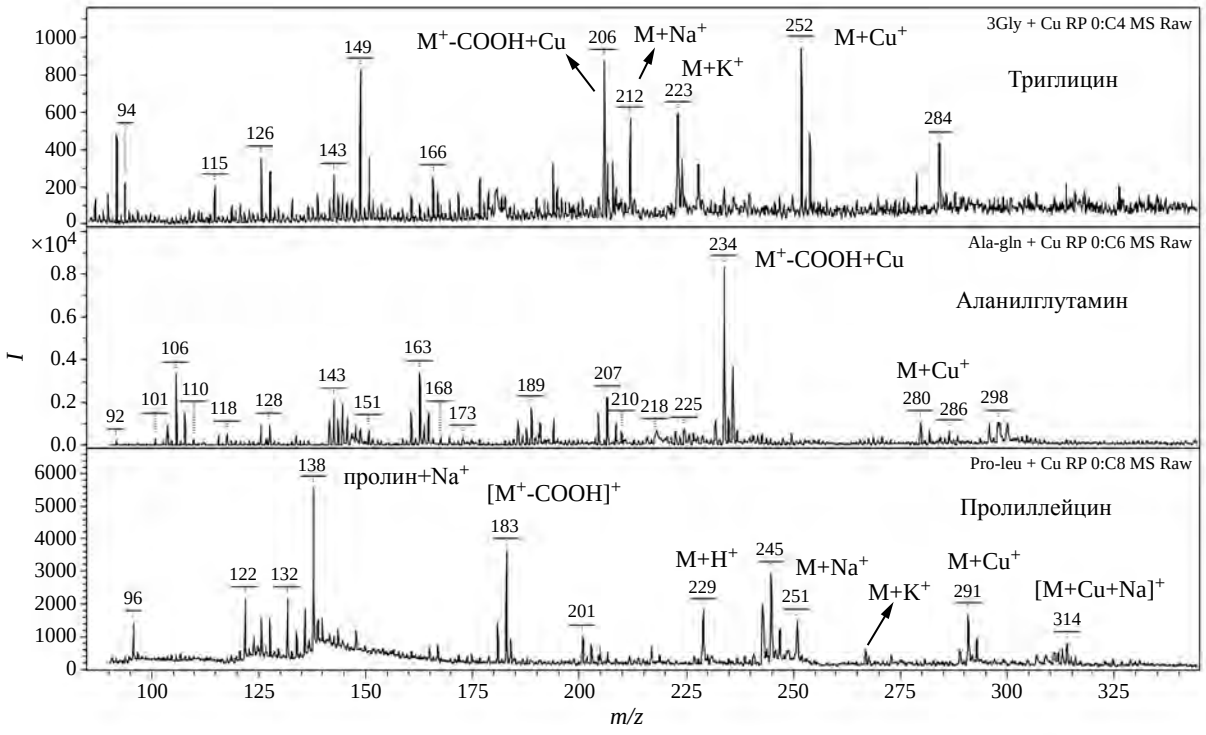

Рис. 6. Масс-спектр ПАЛДИ триглицина, аланилглутамина и пролиллейцина с добавлением раствора соли $CuSO4{\cdot}8H_2O$.

и K с молекулярными массами 212 и 229 Да и кластерный ион пептида $M^+ + Cu$ (с массой 252 Да). В масс-спектре аланилглутамина присутствует ион $M^+ -COOH + Cu$ (с массой 233 Да) и кластерный ион пептида $M^+ + Cu$ (с массой 280 Да). В масс-спектре пептида пролиллейцина обнаружены ион $[M-COOH]^+$, ион пролин + Na^+ (с массой 137 Да), который является продуктом ионмолекулярных реакций пептида, молекулярный ион $M + H^+$ (с массой 229 Да), ионы $M + Na^+$ (с массой 251 Да) и $M + K^+$ (с массой 267 Да) и кластерный ион пептида $M^+ + Cu$ (с массой 291 Да). Таким образом, можно отметить, что в ПАЛДИ масс-спектрах пептидов наблюдаются преимущественно молекулярные ионы, ионы пептидов с Na и K и кластерные ионы пептидов с Cu.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование процессов ионизации пептидов методами ПАЛДИ и ЭРИ. Показано, что в случае фотоионизации пептидов с поверхности (ПАЛДИ) наиболее характерными процессами, проходящими в ионном облаке, являются протонирование и катионирование молекул пептидов и, в гораздо меньшей степени, образование аддуктов с медью. В то же время, инициирование ионизации поверхностью порождает процессы фрагментации пептидов, такие как дегидроксилирование, декарбоксилирование и деаминирование. Также характерен распад пептида по связи C-N.

В отличие от ПАЛДИ ионизация ЭРИ происходит в объеме растворителя и часто с активным участием последнего. А образование микрокапель с большим числом заряженных частиц ведет к агрегации молекул и образованию множества кластерных ионов. Для небольших пептидов эта закономерность в целом подтверждается. При этом более активная агрегация происходит в случае с пептидами, имеющими подвижные протоны или другие анионные центры. Показано, что атомы меди инициируют значительное кластерообразование, причем помимо процессов катионирования в масс-спектрах наблюдается образование ковалентных связей с молекулами пептидов. Судя по данным, при ионизации и агрегации происходит частичная перезарядка ионов меди с изменением степени окисления, что вызывает уход протонов в молекулах исследуемых пептидов. Механизмы данных процессов являются отдельной темой для исследования.

Таким образом, в работе показано, что коротокоцепочечные пептиды могут ионизироваться “мягкими” методами. При этом метод ПАЛДИ достаточно деструктивен, что вызывает потерю интенсивности молекулярного иона и образование

фрагментных ионов. В тоже время, для поиска пептидов на поверхности и их идентификации возможно использование и фрагментных ионов. Очевидно, что при использовании матрицы (метод МАЛДИ) и тандемного режима можно добиться наиболее эффективного определения коротких пептидов в сочетании с идентификацией.

Метод ЭРИ показал возможность кластерообразования и даже образования ковалентных связей между ионами меди и молекулами пептидов. Продемонстрировано, что такой подход может быть использован не только для анализа короткоцепочечных пептидов, но и для всестороннего изучения процессов образования кластерных ионов и ковалентных комплексов с медью.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки высшего образования Российской Федерации. Государственное задание № 125012200583-5 и № 125012200629-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Budimir N., Blais J.-Cl., Fournier F., Tabet J.-Cl.* // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006. V. 20. P. 680. https://doi.org/10.1002/rcm.2363
2. *Chen Y., Chen H., Aleksandrov A., Orlando T.M.* // J. Phys. Chem. C. 2008. V. 112. № 17. P. 6953. https://doi.org/10.1021/jp077002r
3. *Cohen L.H., Gusev A.I.* // Anal. Bioanal. Chem. 2002. V. 373. P. 571. https://doi.org/10.1007/s00216-002-1321-z
4. *Karas M., Krüger R.* // Chem. Rev. 2003. V. 103. № 2. P. 427. https://doi.org/10.1021/cr010376a
5. *Lin L., Weng C., Chen Q.* // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. V. 414. № 1. P. 79.
6. *Chen Y., Chen H., Aleksandrov A., Orlando T.M.* // J. Phys. Chem. C. 2008. V. 112. № 17. P. 6953. https://doi.org/10.1021/jp077002r
7. *Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K.* // Colloid Journal. 2018. № 80. P. 427. https://doi.org/10.1134/S1061933X18040105
8. *Pytskii I.S., Kuznetsova E.S., Buryak A.K.* // Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces. 2020. № 56. P. 272. https://doi.org/10.1134/S2070205120020203
9. *Xinyao Ju, Shuzhen Cheng, Han Li et al.* // Food Chemistry. 2022. V. 390. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133146
10. *Iavorschi M., Lupăescu A., Darie-Ion L. et al.* // Pharmaceuticals. 2022. V. 15(9). https://doi.org/10.3390/ph15091096

INTRODUCTION OF CATIONIZING AGENTS IN SOFT IONIZATION PROCESSES OF SHORT-CHAIN PEPTIDES: LASER DESORPTION AND ELECTROSPRAYING

E. S. Kuznetsova[a], *, I. S. Pytskii[a], and A. K. Buryak[a]

[a] A. N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

**e-mail: eskuznetsova8@yandex.ru*

Abstract. A mass spectrometric study of ionization processes of short peptides of triglycine, alanylglutamine, and prolylleucine by electrospray ionization (ESI) and surface-activated laser desorption/ionization (SALDI) methods in the presence of copper sulfate crystalline hydrate is performed. It is shown that during ESI ionization, the presence of copper ions in the solution initiates the aggregation of peptide molecules with the formation of large associates of up to 7-8 peptide molecules. The influence of the nature of peptides on the nature of ionization processes is studied. At the same time, competitive cationization of peptide molecules by copper ions with the formation of an M+Cu+ ion occurs during ionization by SALDI method. Peptide fragmentation and copper cationization of decarboxylation products are also typical.

Keywords: mass spectrometry, soft ionization methods, cluster formation, peptides, amino acids, cluster ion