



УДК 577.182.62'1.088.5 : 543.51

© 1991 г.

Б. В. Розынов, Ю. В. Жданович, Л. И. Насонова**

ПРИМЕНЕНИЕ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ С ХИМИЧЕСКОЙ ИОНИЗАЦИЕЙ ПРИ СКРИНИНГЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИБИОТИКОВ С ШИРОКИМ СПЕКТРОМ ДЕЙСТВИЯ (АМИНОГЛИКОЗИДЫ И МАКРОЛИДЫ)

*Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина
АН СССР, Москва;*

**Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков Минмедпрома,
Москва*

Представлены результаты масс-спектрометрического анализа аминогликозидных и макролидных антибиотиков. Применение десорбционной химической ионизации позволяет проводить идентификацию этих соединений на ранних этапах поиска.

Антибактериальные антибиотики широкого спектра действия — аминогликозиды и макролиды — нашли разнообразное применение в клинической практике и в значительной степени определяют современное развитие медицинской науки [1]. Поэтому скрининг таких антибиотиков является актуальной задачей.

Под скринингом антибиотиков понимают как поиск новых соединений этого класса, так и обнаружение новых продуцентов уже известных метаболитов с антимикробным действием. Одна из важнейших проблем, возникающих при скрининге, — разработка методов идентификации антибиотиков на самых ранних этапах поиска, порой в многокомпонентных, трудноразделяемых хроматографически смесях продуктов жизнедеятельности микроорганизмов.

Низкая биологическая активность суммарных препаратов аминогликозидов и макролидов и общее небольшое количество вещества, получаемое при первичных исследованиях неселекционированных штаммов-продуцентов из-за низкой исходной активности последних, делает практически невозможным применение традиционных методов идентификации антибиотиков (выделение в чистом виде с последующим сравнением констант с литературными). Использование же различных хроматографических характеристик не во всех случаях приводит к однозначным выводам, особенно при идентификации антибиотиков, близких по структуре и хроматографической подвижности.

Ранее была сделана попытка привлечь методы масс-спектрометрии электронного удара (МСЭУ) и полевой десорбции (МСПД) для идентификации аминогликозидов на ранних этапах их выделения [2].

Наши попытки более широко использовать указанные масс-спектрометрические методы выявили их определенные недостатки. Во-первых, низкая интенсивность молекулярных ионов аминогликозидных антибиотиков в масс-спектрах ЭУ даже для индивидуальных образцов затрудняет обнаружение их в масс-спектрах сложных смесей. Во-вторых, в масс-спектрах ЭУ присутствует большое число пиков осколочных ионов, которые дают ценную информацию в случае установления структуры индивидуального антибиотика, но затрудняют интерпретацию спектров в случае

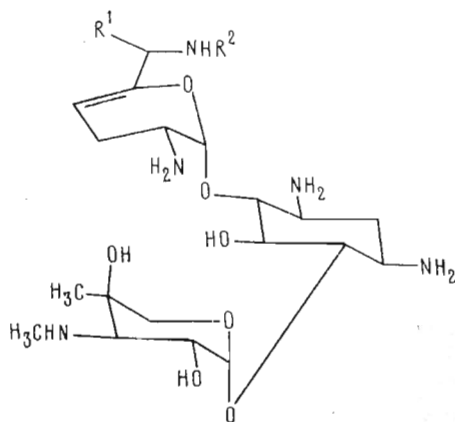
Использованы следующие сокращения: МС — масс-спектрометрия, ЭУ — электронный удар, ПД — полевая десорбция, ДХИ — десорбционная химическая ионизация.

сложных смесей. Кроме того, не все аминогликозиды обладают летучестью, необходимой для их анализа методом МСЭУ. Одним из главных недостатков метода МСПД является практическая невозможность получения воспроизводимых масс-спектров и недостаточная чувствительность метода.

Более простые и хорошо интерпретируемые результаты получаются при анализе антибиотиков масс-спектрометрическим методом десорбционной химической ионизации с газом-реагентом аммиаком (МСДХИ) [3]. Этот метод позволяет получить простые масс-спектры, содержащие в основном пики протонированных молекулярных ионов (MH^+) и их кластеров с аммиаком и незначительное количество пиков осколочных ионов, что существенно облегчает идентификацию аминогликозидных антибиотиков. Кроме того, метод МСДХИ с аммиаком обладает высокой чувствительностью, сравнимой с чувствительностью МСЭУ. Особенностью метода является избирательное взаимодействие газа-реагента с исследуемым веществом, поэтому в последнее время этот метод находит применение для оценки степени чистоты антибиотиков. Так, в одной из работ он использован для оценки гомогенности очищенных компонентов гентамицинового комплекса [4]. Имеются данные по анализу методом МСДХИ канамицинов А, В, С [5]. Однако этим методом с газом-реагентом аммиаком изучались преимущественно антибиотики в виде индивидуальных образцов. В литературе нет данных по его использованию для исследования суммарных препаратов антибиотиков.

Мы предлагаем метод МСДХИ для масс-спектрометрической идентификации аминогликозидных антибиотиков в суммарных препаратах, а также для определения специфических примесей в антибиотиках этой группы.

Прежде всего мы решили вопрос о корректности идентификации аминогликозидов предлагаемым методом. Наличие в спектрах химической ионизации интенсивных пиков ионов MH^+ и $MH^+ + NH_3$ является важной информацией при изучении распределения компонентов по молекулярным массам, однако практически полное отсутствие пиков осколочных ионов, свойственных масс-спектрам ЭУ, затрудняет соотнесение изучаемого компонента с определенной структурой. Поэтому было проведено сравнительное изучение масс-спектров ЭУ и ДХИ модельных соединений с целью обнаружения общих для них пиков осколочных ионов. В качестве модельного соединения для сравнительного анализа нами был выбран аминогликозид сизомицин.



сизомицин: $R^1 = H$; $R^2 = H$; M_r 447

G-52: $R^1 = H$; $R^2 = CH_3$; M_r 461

В масс-спектрах ДХИ сизомицина имеется пик протонированного молекулярного иона с m/z 448. В отличие от масс-спектра ЭУ в спектре ДХИ отсутствуют пики осколочных ионов в интервалах значений m/z 200—320 и 325—447. Однако в обоих спектрах присутствует пик, соответствующий структурному фрагменту сизомицина — гарамину с m/z 322. Наличие в спектре МСДХИ протонированного молекулярного иона

и пика крупного структурного фрагмента позволяет достоверно идентифицировать модельный объект.

После исследования модельного объекта представлялось целесообразным проверить корректность анализа методом МСДХИ на аминокгликозиде с заранее неизвестной структурой. В спектре МСДХИ взятого для анализа аминокгликозида присутствуют пики протонированного молекулярного (m/z 497) и осколочного (m/z 322, гентамицин) ионов, которые характерны для масс-спектра ЭУ антибиотика G-418 [6]. При последующем анализе контрольного антибиотика с помощью МСЭУ было показано, что пики его осколочных ионов полностью соответствуют распаду антибиотика G-418 при электронном ударе [6], и таким образом подтверждено первоначальное отнесение.

Как видно из приведенных данных, метод химической ионизации дает корректную информацию о природе аминокгликозидных антибиотиков по пику молекулярного иона и может быть рекомендован при анализе смесей.

Этот метод был апробирован при изучении суммарного препарата, выделенного из культуры, которая предположительно могла оказаться продуцентом группы фортимицина. В масс-спектре ЭУ суммарного препарата присутствуют пики ионов с m/z 478, 464, 450, 420, 402, 322, характерные для масс-спектров гентамицинового комплекса антибиотиков [6], а также пики с m/z 322, 334, 348, 391, 405, 433, которые можно было интерпретировать [7] как фрагменты фортимициновых антибиотиков. На основании такого предварительного масс-спектрометрического анализа мы предположили, что изученный препарат представляет собой сложную смесь антибиотиков гентамицинового и фортимицинового рядов. Однако при изучении этой сложной смеси методом МСДХИ в масс-спектрах обнаруживаются только пики протонированных ионов с m/z 478, 464, 450, принадлежащие гентамицинам C_1 , C_2 и C_{1a} соответственно [6]. Следовательно, изучаемый суммарный препарат состоит только из комплексов гентамицинов. В дальнейшем это подтвердилось при идентификации компонентов суммарного препарата классическими методами (данные не приведены). На этом примере прослеживается один из недостатков МСЭУ — наличие в спектре большого числа осколочных ионов, которые затрудняют анализ сложных смесей и могут привести к неверным выводам — и подчеркиваются преимущества метода ДХИ.

Как указывалось выше, не все аминокгликозиды из-за их **низкой** летучести могут быть идентифицированы методом МСЭУ. Так, при анализе небрамицинового комплекса, в состав которого как основные компоненты входят тобрамицин, канимицин Б и апромицин, не удавалось методом МСЭУ получить полную информацию, так как один из компонентов этого комплекса — апромицин — нелетуч [8]. Только методом МСДХИ удалось идентифицировать основные составные небрамицинового комплекса по протонированным молекулярным ионам с m/z 540, 484, 468, соответствующим апромицину, канамицину Б и тобрамицину.

Полученные результаты показывают, что масс-спектрометрический анализ с ДХИ позволяет проводить корректную идентификацию аминокгликозидных антибиотиков без их предварительного хроматографического разделения.

Возможности этого метода мы использовали при изучении двух штаммов, отобранных в качестве потенциальных продуцентов важного в терапевтическом отношении аминокгликозидного антибиотика сизомицина и одного штамма как продуцента гентамицина.

В масс-спектре МСДХИ суммарного препарата одного из штаммов-продуцентов сизомицина наряду с пиком протонированного молекулярного иона сизомицина с m/z 448 присутствует интенсивный пик при m/z 469, который может соответствовать протонированному молекулярному иону гентамицина А [6].

В МСДХИ суммарного препарата другого штамма-продуцента сизомицина наряду с названными выше пиками протонированных молекулярных ионов присутствует протонированный ион с m/z 462, который можно отнести к протонированному молекулярному иону антибиотика G-52.

В обоих спектрах наблюдается также протонированный ион с m/z 322, который соответствует продукту деструкции сизомицина — гарамину (см. выше). Из спектра МСДХИ было выявлено также, что наряду с указанными антибиотиками штаммы-продуценты производят значительное количество близких к сизомициновой группе аминогликозидов.

При дальнейшем изучении суммарных препаратов антибиотики сизомицин, G-52, гентамицин А и продукт деструкции гарамин были выделены в индивидуальном состоянии и идентифицированы сравнением физико-химических констант с литературными данными, что может свидетельствовать о корректности идентификации указанных метаболитов в суммарных препаратах методом МСДХИ.

При изучении методом МСДХИ суммарного препарата гентамицина, выделенного из культуральной жидкости отобранного штамма-продуцента, были зафиксированы пики протонированных ионов гентамицинов C_{1a} , C_2 , C_1 с m/z 450, 464, 478, а также аналогичные пики некоторых минорных компонентов гентамицинового комплекса: гентамицин А с m/z 469, гарамин с m/z 322 и др.

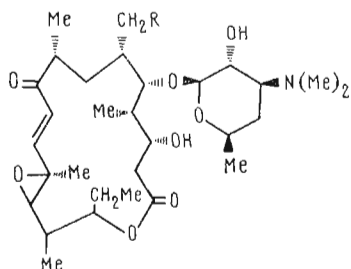
Представлялось интересным использовать метод МСДХИ с аммиаком при изучении N-ацильных аминогликозидных антибиотиков типа амикацина [9] и бутирозина [10].

Было установлено, что в масс-спектре ДХИ амикацина отсутствует пик протонированного молекулярного иона MH^+ с m/z 586. В то же время установлено присутствие пика «псевдомолекулярного» иона с m/z 585, который образуется в результате отщепления молекулы воды от протонированного молекулярного иона, образовавшего кластер с молекулой аммиака ($MH - H_2O + NH_3^+$). Пик этого иона, однако, можно использовать при идентификации антибиотиков данной группы. В масс-спектре ДХИ бутирозина отсутствует не только молекулярный ион MH^+ с m/z 556, но и псевдомолекулярный M^+ с m/z 555. Обнаружен только ион с m/z 538, соответствующий отщеплению воды от протонированного молекулярного иона MH^+ .

При масс-спектрометрическом анализе аминогликозидных антибиотиков методом МСДХИ нами было отмечено, что наряду с протонированными молекулярными ионами в некоторых случаях образуются и димерные кластерные ионы ($2M + H^+$). Например, такие кластерные ионы были обнаружены в спектрах ДХИ сизомицина, гентамицина, тобрамицина, в то время в масс-спектрах канамицинов пики аналогичных ионов отсутствуют.

Представляло большой интерес расширить область применения разработанного метода идентификации и применить его для анализа суммарных препаратов антибиотиков, имеющих отличную от аминогликозидов структуру. В качестве такого объекта нами были выбраны антибиотики, относящиеся к группе макролидов.

Антибиотики этой группы образуются при биосинтезе как в культурах стрептомицетов, так и семейства *Micromonospora* и в последнем случае могут быть сопутствующими метаболитами аминогликозидных антибиотиков или являться основными компонентами антибиотического комплекса, образующегося при ферментации. Характерным примером такого антибиотического комплекса может служить образование при ферментации культур-продуцентов из семейства *Micromonospora* антибиотиков-макролидов из группы розамицина (X).



R = CHO — розамицин

R = CH₂OH — ювенимицин A₄

R = Me — M4365 A₁

В процессе направленного скрининга культур-продуцентов макролидных антибиотиков были выделены две культуры, продуцирующие метаболиты, суммарные препараты которых при определении антимикробного спектра показали перекрестную устойчивость с макролидными антибиотиками и обладали низкой антибиотической активностью.

Оказалось, что метод МСДХИ и в этом случае эффективен для идентификации биологически активных веществ в суммарных препаратах. Из литературы известно, что этот метод применялся для изучения макролидных антибиотиков только на чистых образцах [11].

При рассмотрении масс-спектра ДХИ суммарного препарата, выделенного из одной из культур, видно, что имеются пики протонированных ионов с m/z 584, 582, 568, соответствующие молекулярным массам ювенимицина A_4 , розамицина и антибиотика М-4365. А. Методом масс-спектрометрии высокого разрешения были определены точные значения масс некоторых ионов и на этом основании установлены брутто-формулы для ионов с m/z 583 ($C_{31}H_{53}NO_9$), 581 ($C_{31}H_{51}NO_9$), 567 ($C_{31}H_{53}NO_8$), которые соответствуют брутто-формулам ювенимицина A_4 , розамицина и антибиотика М-4355 А [12]. Таким образом, при использовании масс-спектрометрии была проведена идентификация розамицина и двух близких метаболитов без его разделения в суммарном препарате.

Предложенный метод идентификации, основанный на указанном варианте спектрометрии, был использован также для анализа состава комплекса другого макролидного антибиотика — эритромицина, продуцируемого различными штаммами культуры *Streptomyces erythreus*. Было установлено, что суммарные препараты, выделенные по стандартной схеме из культуральных жидкостей изучаемых штаммов, содержат эритромицины А, В, С, Е и ангидроэритромицины А и С (MH^+ 734, 718, 720, 748, 702, 716 соответственно).

Метод МСДХИ был использован совместно с ВЭЖХ при изучении компонентного состава культуральных жидкостей, полученных при ферментации различных штаммов-продуцентов эритромицина. На основании полученных данных был проведен отбор продуцентов, образующих наименьшее количество родственных примесей.

Экспериментальная часть

Масс-спектры ХИ сняты на масс-спектрометре МАТ-44, газ-реагент — аммиак, энергия ионизирующих электронов 200 эВ, скорость нагрева эмиттера 200° С/мин.

Масс-спектры электронного удара сняты на масс-спектрометре МАТ 44S, температура ионизационной камеры 180—200° С, энергия ионизирующих электронов 70 эВ. Масс-спектры высокого разрешения получены на приборе MS-902.

Суммарные препараты аминокликозидов выделяли из фильтрата культуральной жидкости сорбцией на карбоксильном катионите в NH_4^+ -форме и десорбцией со смолы водным раствором аммиака. Элюаты упаривали досуха, осадок растворяли в воде и раствор пропускали через сильно основной анионит в OH^- -форме. Щелочные фракции упаривали досуха. Остаток растворяли в метаноле и вещество из метанольного раствора наносили на эмиттер, который вводили в ионизационную камеру.

Суммарные образцы макролидов выделяли из нативного раствора экстракцией хлороформом при щелочных значениях pH. Экстракты упаривали досуха, остаток растворяли в хлороформе и анализируемый образец вносили в ионизационную камеру, используя эмиттер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Навашин С. М., Фомина И. П. Рациональная антибиотикотерапия. М.: Медицина, 1982.
2. Розынов В. В., Жданович Ю. В., Кузовков А. Д. Механизм биосинтеза антибиотиков. М.: Наука, 1984. С. 182—201.

3. Жданович Ю. В., Богданова И. А., Розынов Б. В. и др. // 16-я конференция ФЕБО. Тез. докл. М.: Наука, 1984. С. 412.
4. Poritt R. T., Games D. E., Rossiter M. // Biomed. mass spectrum. 1976. V. 3. P. 232—234.
5. Takeda N., Umemura M., Harada K. // J. Antibiot. 1981. V. 34. № 3. P. 617—621.
6. Daniels P. J. L., Mallams A. K., Weinstein J., Wright J. U., Milne G. W. A. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 1976. P. 1078—1087.
7. Nara T., Jamamoto M., Kawamoto I. // J. Antibiot. 1977. V. 30. № 7. P. 534—540.
8. O'Connor S., Lam L. K. T. // Abstr. Papers Amer. Chem. Soc. Meeting. 1973. V. 165. MEDI 6.
9. Kawaguchi M., Naito T., Nakagawa S., Fujisawa K. // J. Antibiot. 1972. V. 25. № 12. T. 695—708.
10. Woo P. W., Dion H. W., Bartz Q. R. // Tetrahedron Lett. 1971. V. 12. № 28. P. 2625—2628.
11. Suzuki M., Harada K., Takeda M. // Biomed. mass spectrum. 1981. V. 8. P. 332—335.
11. Kinumaki A., Harada K., Suzuki T., Suzuki M., Okuda T. // J. Antibiot. 1977. V. 30. № 6. P. 450—454.

Поступила в редакцию
4.VII.1990

B. V. ROZYNOV, Yu. V. ZHDANOVICH*, L. I. NASONOVA *

USE OF MASS-SPECTROMETRY WITH CHEMICAL IONIZATION IN SCREENING OF ANTIBACTERIAL ANTIBIOTICS WITH BROAD SPECTRUM OF ACTIVITY (AMINOGLYCOSIDES AND MACROLIDES)

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow:*

** National Research Institute of Antibiotics, Ministry of Medical
Industry of the USSR, Moscow*

It is shown that mass-spectrometry with ammonia desorption chemical ionization (ADCI) can be used for identification of aminoglycosides and macrolides at the initial stages of screening. ADCI can also be used for selection of strains which form the lowest amounts of by-products, as well as for optimization of biosynthetic conditions.