

MASSENSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN POLYENANTIBIOTIKA. FRAGMENTIERUNGSVERHALTEN EINIGER TETRAENE

K. DORNBERGER,*^a D. VOIGT,^b W. IHN,^a J. VOKOUN^c und H. THRUM^a

Akademie der Wissenschaften der DDR, Forschungszentrum für Molekularbiologie und Medizin, Zentralinstitut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena,^a Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale^b und Institut für Mikrobiologie der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Prag^c

(Received in Germany 29 December 1975; Received in the UK for publication 26 July 1976)

Abstract—By means of electron impact, electron attachment and DADI (direct analysis of daughter ions) mass spectroscopy the carbon skeletons of the aglycones of pimaricin, lucensomycin, tetrin A and B, rimocidin, and tetramycin have been determined using the original compounds. On the basis of these results the molecular weights of these polyene antibiotics have been derived. High resolution mass spectroscopy can be used effectively in the investigation on the structural arrangement of compounds related to these tetraene antibiotics.

Polyenantibiotika werden vor einer Vielzahl von Streptomycetenarten gebildet. Mehr als 60 Polyenantibiotika wurden inzwischen beschrieben. Sie sind nicht nur in bezug auf ihre hohe Aktivität gegenüber Hefen und Pilzen sehr ähnlich, sondern sie weisen auch sehr viele strukturelle Ähnlichkeiten auf. Für alle charakteristisch ist der mehrfach hydroxylierte makrocyclische Lactonring, der drei bis acht konjugierte Doppelbindungen enthalten kann, die im allgemeinen all-*trans*-Konfiguration besitzen. Als Substituenten am Aglykon sind glykosidisch gebundene Aminosucker, Keto-, Carboxyl- und Epoxygruppen sowie aromatische und aliphatische Seitenketten zu nennen. Das Molekulargewicht dieser Substanzen liegt in der Größenordnung von 600–1300.

Die massenspektroskopische Bestimmung der Molekülgröße ist allgemein bei Polyenantibiotika mit glykosidisch gebundenem Aminosucker sehr schwierig. Aufgrund der Größe und Kompliziertheit dieser Moleküle war es bisher nur vereinzelt möglich, durch die Untersuchung entsprechender Derivate, z.B. Trimethylsilyl- oder Acetylverbindungen, massenspektroskopische Aussagen über das Molekulargewicht zu erhalten.^{1,2} Diese Methoden sind aber mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet, da bei der Derivatbildung Massenzahlen bis zu 1800 bestimmt werden müssen.

Unter diesem Aspekt gewinnt die Felddesorptions - Massenspektrometrie als neue Ionisierungstechnik zunehmend an Bedeutung.³ Allerdings wird dabei die Fragmentierungstendenz des Molekülions herabgesetzt, so dass wesentliche Strukturinformationen verlorengehen.

Eines der grundlegenden Probleme bei den Untersuchungen zur Struktur dieser makroliden Polyene ist die Bestimmung der Aglykon - Kohlenstoffzahl. Erst die Kenntnis dieser Größe lässt, in Verbindung mit anderen analytischen Daten, Rückschlüsse auf die Molekülgröße zu. Die Bestimmung des Aglykon - Kohlenstoffgerüsts erfolgte bisher nach Cope und Mitarbeitern⁴ durch reduktiven Abbau zu einem Grundkohlenwasserstoff und dessen Charakterisierung.

Wir haben durch den kombinierten Einsatz der Elektronenstoß- und Elektronenanlagerungs-Massen-

spektroskopie (EA- bzw. EI-MS) sowie der "Direct Analysis of Daughter Ions" (DADI - Massenspektrometrie)⁵ den massenspektroskopischen Zerfallsprozess der Tetraenantibiotika Lucensomycin, Pimaricin, Tetrin A und B, Rimocidin und Tetramycin sowie deren Acetyl-derivate untersucht. Dabei gelang es, durch die Massenfeinbestimmung (Peak Matching) charakteristischer Schlüsselbruchstücke sowie durch die Untersuchung metastabiler Übergänge mit Hilfe der DADI - Methode bestimmte Gesetzmässigkeiten festzustellen, die es gestatten, Aussagen über die Aglykon- bzw. Molekülgröße unbekannter Tetraenantibiotika auch ohne vorherige Derivatbildung bzw. Abbaureaktionen zu treffen.

Bei der EA-MS erfolgt eine Ionisierung durch Plasmaelektronen niedriger Energie (2–4 eV). Neben den hierbei ablaufenden Elektronenanlagerungsprozessen werden durch Stossionisation mit Elektronen der Energie 6–10 eV auch positive Ionen gebildet, so dass von der

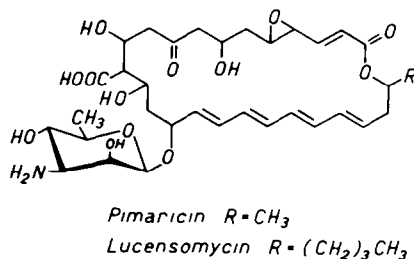


Abb. 1. Struktur des Pimaricins⁶ und Lucensomycins.⁷

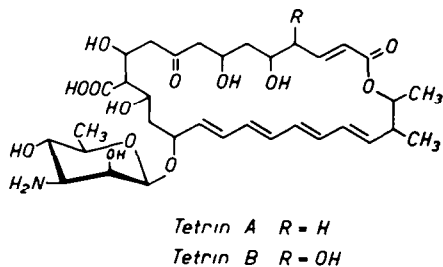
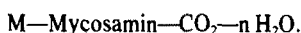


Abb. 2. Struktur der Tetrine A* und B.*

gleichen Substanzprobe in zeitlich kurzer Folge Anionen- und Kationenspektren aufgenommen werden können.¹⁰

Obwohl die EA-MS oftmals erfolgreich zur Molekulargewichtsbestimmung empfindlicher Naturstoffe angewandt werden kann, erhält man bei den Tetraenantibiotika keinen Molpeak, dafür aber ein charakteristisches Fragmentierungsmuster. Ein entsprechendes Zerfallsschema tritt auch bei den Kationenspektren auf. Die vergleichsweise aufgenommenen hochaufgelösten EI-Spektren mit 70 eV zeigen das analoge Fragmentierungsmuster, so dass beide Kationenspektrenarten ebenso wie das Anionenspektrum prinzipiell vergleichbare Aussagen gestatten.

Der massenspektroskopische Zerfall ist bei den untersuchten Tetraenantibiotika Pimaricin, Lucensomycin, Tetrin A und B durch folgende Reaktionen gekennzeichnet:



Die Mycosaminabspaltung wurde anhand acetylierter Tetraene untersucht, da die Ausgangsverbindungen bedingt durch ihre geringe Flüchtigkeit und thermische Labilität keine genauen Aussagen über die einzelnen Schritte der Aminozucker - Abspaltung gestatten. Ein Vergleich der Anionen- und Kationenspektren zeigt, dass die Spaltung der Glykoside ausschliesslich zwischen dem Glykosidsauerstoff und dem Aglykon unter Eliminierung des Aminozuckers erfolgt. In beiden Spektrenarten ist der Fragmentpeak des Triacetylmycosamins (1) bei m/e 289 nachweisbar. Dieses Ion wird durch Wasserstoffwanderung aus dem Aglykonteil mit anschliessender Spaltung der glykosidischen Bindung gebildet. Des weiteren treten Peaks höherer Intensität bei den Massenzahlen $M-1$ (m/e 288) und $M+1$ (m/e 290) auf. Für das Ion m/e 290 muss eine intermolekulare Wasserstoffübertragung angenommen werden, die charakteristisch für die meisten Zuckerderivate ist.¹¹ Das Ion m/e 288 entsteht durch Spaltung der glykosidischen Bindung. In den Kationenspektren tritt ausserdem ein sehr intensiver Peak bei m/e 272 auf, der dem Triacetylmycosaminyl - Ion (3) zuzuordnen ist (siehe auch Pandey *et al.*⁸). Da dieser Peak in den Anionenspektren fehlt, die Fragmentierung der Aglykone unter den Bedingungen der EA- und EI-MS aber analog verläuft, kann angenommen werden, dass dieses Ion bei höheren Ionisierungsspannungen entweder durch Sauerstoffabspaltung aus dem primär gebildeten Triacetylmycosaminyl - Ion (2) oder durch Hydroxylabspaltung aus dem Triacetylmycosamin (1) entsteht (Abb. 3).

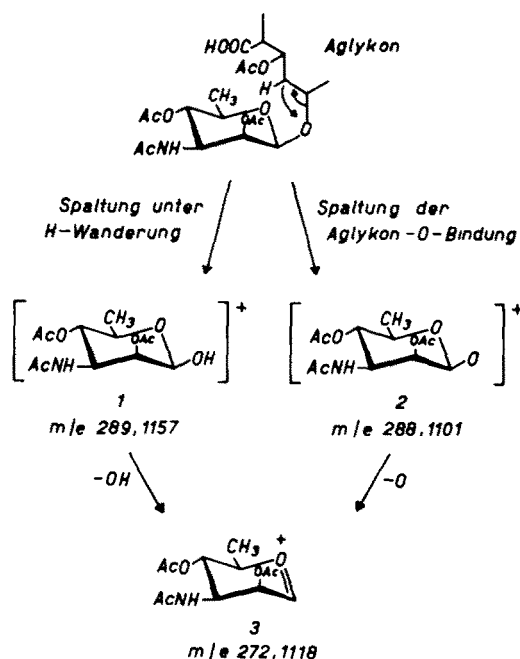


Abb. 3. Ausschnitt aus dem EA-MS (2-4 eV) und EI-MS (6-10 eV) des acetylierten Pimaricins.

Die angenommene Entstehung des Triacetylmycosaminyl - Ions (3) wird durch die DADI - Spektren der Ionen 1 und 2 mit den Massen 289, 1157 bzw. 288, 1101 bestätigt.

Bei der DADI - Methode werden die metastabilen Zerfallsreaktionen erfasst, die im feldfreien Raum zwischen dem magnetischen und elektrostatischen Sektorfeld entstehen. Das Magnetfeld wird auf die Massenzahl zu untersuchender Molekül- oder Bruchstückionen eingestellt. Unterliegen diese Ionen weiteren Zerfallsreaktionen auf dem Flugweg zwischen beiden Feldern, so kann ein Massenspektrum aller nachfolgenden Tochterionen aufgenommen werden.

So wird im Scan des elektrostatischen Ablenkfeldes nach Einstellung einer entsprechenden Magnetfeldstärke sowohl aus dem ausgewählten Ion 1 als auch aus dem Ion 2 als Folgeprodukt das Triacetylmycosaminyl - Ion (3) mit der Masse 272, 1118 erfasst. Eine analoge Fragmentierung zeigen auch die Gibberellin - O (3) - glucosid - acetate.¹²

Zur Charakterisierung der Grösse des Makrolidsystems können bereits die nativen Verbindungen eingesetzt

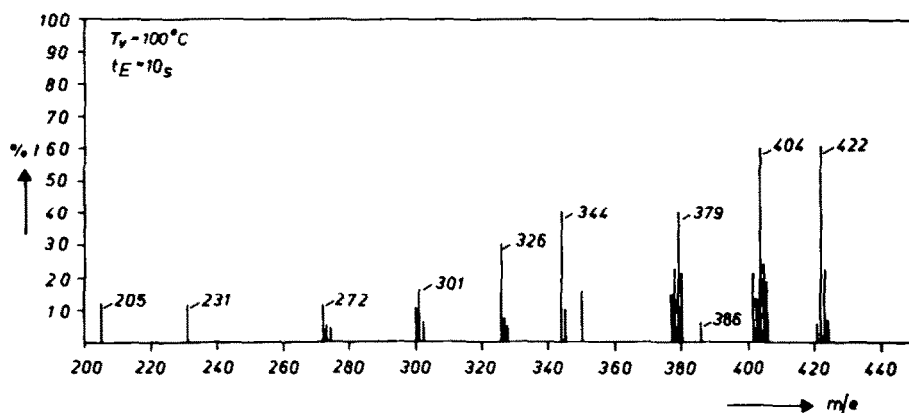


Abb. 4. Anionenspektrum des Pimaricins.

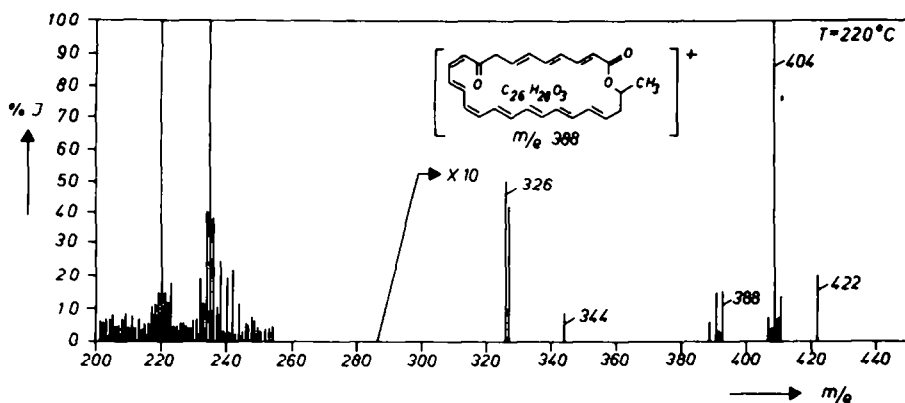


Abb. 5. Kationenspektrum des Pimaricins (70 eV).

werden. Bei unseren Messungen fanden wir, dass diese Antibiotika unter den Bedingungen der EA- und EI-MS unter Verlust des Zuckerbausteins, mehrerer Moleküle Wasser und Decarboxylierung der Carboxylgruppe in ein weitgehend konjugiertes cyclisches Ion besonderer Stabilität übergehen. Dies wird mit folgenden Beispielen belegt:

Pimaricin ($C_{33}H_{47}NO_1$, MG: 665).

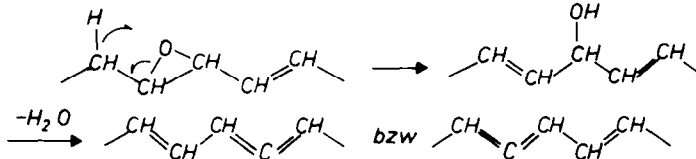
Für die in den Kationenspektren des Pimaricins auftretenden charakteristischen Peaks wurden durch Hochauflösung folgende Zusammensetzungen ermittelt, die analog auch für die entsprechenden Anionenspektren zutreffen sollten:

m/e 422,2093 ($C_{26}H_{30}O_5$, M-Mycosamin- CO_2-2H_2O);

m/e 404,1986 ($C_{26}H_{28}O_4$, M-Mycosamin- CO_2-3H_2O);

m/e 386,1872 ($C_{26}H_{26}O_3$, M-Mycosamin- CO_2-4H_2O).

Die gleichen Intensitäten der Peaks bei m/e 386 und 388 (M-Mycosamin- CO_2-3H_2O-O) lassen weiterhin den Schluss zu, dass die Epoxygruppe wahrscheinlich sowohl unter Sauerstoff als auch unter Wasser - Abspaltung abgebaut werden kann. Die gleichen Verhältnisse trifft man auch beim Lucensomycin an. In Analogie zu dem massenspektrometrischen Abbau aliphatischer Epoxide¹³ könnte für die Eliminierung des Epoxid - Sauerstoffs unter Wasserabspaltung folgendes Schema formuliert werden:



Die Wasserabspaltung aus Epoxiden erwähnen auch Baldus und Mitarbeiter¹⁴ im Rahmen ihrer Untersuchungen über das massenspektrometrische Verhalten von Carotinoid - Epoxiden sowie Brown und Mitarbeiter bei ihren Arbeiten über Bufadienolide.¹⁵

Lucensomycin ($C_{36}H_{53}NO_{13}$, MG: 707).

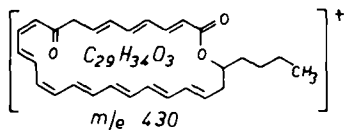


Abb. 6. Fragmentierung des Lucensomycins (70 eV).

Für die entsprechenden Signale gilt folgende Zusammensetzung:

m/e 464,2550 ($C_{29}H_{36}O_5$, M-Mycosamin- CO_2-2H_2O);

m/e 446,2430 ($C_{29}H_{34}O_4$, M-Mycosamin- CO_2-3H_2O);

m/e 430,2467 ($C_{29}H_{34}O_3$, M-Mycosamin- CO_2-3H_2O-O);

m/e 428,2322 ($C_{29}H_{32}O_3$, M-Mycosamin- CO_2-4H_2O).

Für die Tetrine A und B ergeben sich folgende Peakserien: Tetrin A ($C_{34}H_{51}NO_{13}$, MG: 681).

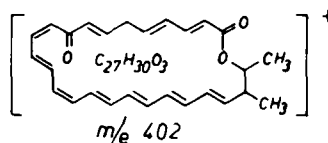


Abb. 7. Fragmentierung des Tetrin A (70 eV).

m/e 420 ($C_{27}H_{32}O_4$, M-Mycosamin- CO_2-3H_2O);

m/e 402,2157 ($C_{27}H_{30}O_3$, M-Mycosamin- CO_2-4H_2O).

Tetrin B ($C_{34}H_{51}NO_{14}$, MG: 697)

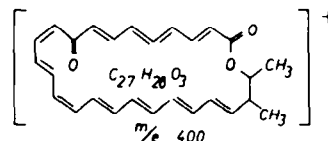


Abb. 8. Fragmentierung des Tetrin B (70 eV).

m/e 454 ($C_{27}H_{34}O_6$, M-Mycosamin- CO_2-2H_2O);

m/e 436,2240 ($C_{27}H_{32}O_5$, M-Mycosamin- CO_2-3H_2O);

m/e 418,2116 ($C_{27}H_{30}O_4$, M-Mycosamin- CO_2-4H_2O);

m/e 400,2050 ($C_{27}H_{28}O_3$, M-Mycosamin- CO_2-5H_2O).

Der Zerfall der untersuchten Tetraenantibiotika wird auch durch die DADI - Spektren ausgewählter Bruchstückionen bestätigt. In den DADI - Spektren treten als Folgeprodukte der Bruchstückionen im oberen Massbereich ausschliesslich Ionen auf, die aus der stufenweisen Abspaltung eines Moleküls Wasser resultieren:

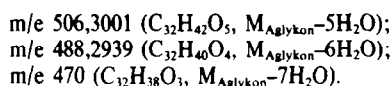
Pimaricin $422 \rightarrow 404 \rightarrow 386$
 Lucensomycin $464 \rightarrow 446 \rightarrow 428$.

Die beobachteten Abbaureaktionen sind, wie die Spektren beweisen, bei den untersuchten Tetraenantiobiotika offensichtlich die Regel und nicht die Ausnahme.

Ähnliche, mehrfach konjugierte cyclische Ionen fanden auch Haegele und Desiderio jr.¹⁶ in den Massenspektren der pertrimethylsilylierten Polyene Nystatin, Amphotericin B und Pimaricin.

Es erscheint deshalb zulässig, diese Regel bei der Strukturaufklärung unbekannter Tetraenantiobiotika anzuwenden. Aufgrund des Fragmentierungsverhaltens bei der Kationen- und Anionen - Massenspektroskopie lassen sich wichtige Rückschlüsse auf die Ringgröße des Aglykons ziehen, ohne dass durch eine Folge chemischer Abbaureaktionen nach Cope⁴ der Grundkohlenwasserstoff bestimmt werden muss.

Diese Methode erweist sich auch am Beispiel des Rimocidins als anwendbar. Von diesem Tetraen ist bisher nur ein Strukturvorschlag für das Aglykon beschrieben worden.¹⁷ Die Grundlage hierfür lieferte der chemische Abbau zum Grundkohlenwasserstoff, welcher als 3 - Methyluntriacontan ($C_{32}H_{66}$) identifiziert worden ist. Die im hochaufgelösten Kationenspektrum auftretenden charakteristischen Signale entsprechen folgender Zusammensetzung:



Damit konnten wir die Größe des Aglykons durch MS bestätigen.

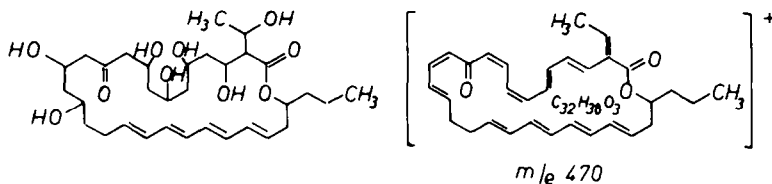


Abb. 9. Struktur des Rimocidin-Aglykons sowie mögliches Fragmentierungsign.

Bei Kenntnis der Art und Anzahl der funktionellen Gruppen lässt sich neben der Größe des Aglykons auch das Molekulargewicht eines strukturell unbekannten Tetraenantiobiotikums ermitteln. So weisen die EA- und EI-Massenspektren des von uns isolierten Tetraens Tetramycin¹⁸ einen charakteristischen Peak bei $m/e \ 416$ auf, der folgender Zusammensetzung entspricht: $C_{28}H_{32}O_3$. Des Aglykon besteht demnach aus 29 C-Atomen, denn durch IR-spektroskopische Messungen und durch Äquivalenzbestimmungen lässt sich im Tetramycin-Aglykon eine Carboxylgruppe nachweisen, die unter massenspektroskopischen Bedingungen leicht decarboxyliert. Aus dem 1H -NMR-Spektrum des acetylierten Perhydro-Tetramycins kann man weiterhin entnehmen, dass das Tetramycin sechs Hydroxylgruppen enthält, von denen zwei dem Aminosucker Mycosamin und vier dem Aglykon zuzuordnen sind. Damit errechnet sich ein Molgewicht von $416 + 44 (CO_2) + 72 (4H_2O) + 163$ (Mycosamin) = 695, das der Bruttoformel $C_{35}H_{53}NO_{13}$ entspricht und mit den durch die Elementaranalyse ermittelten Daten gut übereinstimmt. Durch Felddesorptions - Massenspektrometrie konnte das ermittelte Molekulargewicht bestätigt werden. Der Basispeak liegt hier bei $m/e \ 696$, das entspricht einem $M + H$ -Ion. Aufgrund dieser Ergebnisse müssen wir die bereits früher

angegebene Bruttoformel¹⁸ für das Tetramycin ($C_{34}H_{53}NO_{14}$) revidieren.

Neben der Bestimmung des Aglykons und der damit erhaltenen Hinweise auf das Molekulargewicht kann man anhand der durch die Fragmentierung gewonnenen Daten auch neu isolierte Tetraenantiobiotika sehr schnell differenzieren und identifizieren.

Durch weitere massenspektroskopische Untersuchungen an Pentaen-, Hexaen- und Heptaenantiobiotika muss geprüft werden, ob das charakteristische Fragmentierungsmuster allgemeine Gültigkeit für Polyenantibiotika besitzt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Anionen- und Kationenspektren (6–10 eV) wurden mit einem Elektronenlagerungsmassenspektrographen des Forschungsinstitutes M. v. Ardenne, Dresden (DDR) aufgenommen.

Die Substanz (0.1–1 mg) wird in eine Glaskapillare überführt, deren Aussendurchmesser 2 mm beträgt. Ein 10 bis 15 mm langes Stück der Kapillare mit der Probe wird in die Bohrung eines elektrisch heizbaren Metallblocks eingesteckt, über eine Vakuumschleuse in die Ionenquelle eingebracht und auf die erforderliche Verdampfungstemperatur T_v erhitzt. In Abhängigkeit von T_v , der Belichtungszeit t_b und anderen Parametern wird nacheinander eine Serie von Spektren auf einer Photoplatte (ORWO UV2- oder Ilford Q2-Typ) vom Format 6.5×18 cm registriert. Zwischen den Expositionen kann das Massenspektrum auf dem Fluoreszenzschirm eines Ionenbildwandlers beobachtet werden.

Die photographisch aufgenommenen Spektren werden mikrophotometrisch registriert und in der üblichen Form (vgl. Abb. 4,

5) wiedergegeben, wobei die relative Intensität der einzelnen Peaks, bezogen auf den jeweils höchsten Peak des Spektrums, über der Massenzahl aufgetragen ist.

Die 70 eV - Kationenspektren wurden mit einem AEI MS 902 S unter folgenden Bedingungen aufgenommen: Elektronenstrom 100 mA, Elektronenenergie 70 eV, Beschleunigungsspannung 8 kV, Auflösung ca. 1500, Quelltemperatur 200–250°C. Die Einführung der Proben erfolgte über den Direkteinlass. Die genaue Massenbestimmung wurde mit einer Auflösung von ca. 15000 bei sonst analogen Bedingungen unter Anwendung der "peak-match" - Technik mit Heptacosfluorbutylamin als Referenzverbindung durchgeführt.

Die DADI-Analysen wurden mit einem Massenspektrometer Varian MAT 311 durchgeführt. Temperatur der Ionenquelle 250–350°C. Ionisation durch Elektronenstoß (70 eV). Proben temperatur 180–250°C.

Danksagung—Herrn Dr. G. Lehmann, Zentralinstitut für Organische Chemie der AdW der DDR, Berlin-Adlershof, sowie Herrn Prof. Dr. K. Schreiber, Institut für Biochemie der Pflanzen der AdW der DDR, Halle, möchten wir für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danken.

Für die uns freundlicherweise zur Verfügung gestellten Substanzproben danken wir vielmals Herrn Dr. G. Cassinelli, Farmitalia, Milano, Italy (Lucensomycin); Herrn Doz. Dr. L. Falkowski, Polytechnical University, Gdansk, Poland (Rimocidin); Herrn Dr. P. L. Hoogland, Gist-Brocades nv, Delft,

Niederlande (Pimaricin) und Herrn Prof. Dr. K. L. Rinehart, Jr., University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, USA (Tetrin A und B).

Für die Mitarbeit bei der Aufnahme der Massenspektren am Massenspektrometer MS 902 S (AEI) sowie wichtige Hinweise danken wir den Herren Dr. P. Franke und Chem.-Ing. W. Zöpfel vom MS - Labor der Abteilung Chemische Analytik des Zentralinstitutes für Molekularbiologie der AdW der DDR in Berlin-Buch.

Für die Aufnahme des Tetramycin - Felddesorptions - Massenspektrums sind wir den Herren K. L. Maurer und Dr. U. Rapp, Varian MAT GmbH., Bremen, BRD, zu Dank verpflichtet.

LITERATUR

- ¹B. F. Golding, R. W. Rickards und M. Barber, *Tetrahedron Letters* 2615 (1964).
- ²R. C. Pandey und K. L. Rinehart, Jr., *J. Antibiot.* **23**, 414 (1970).
- ³K. L. Rinehart Jr., J. C. Cook, Jr., K. H. Maurer und U. Rapp, *Ibid.* **27**, 1 (1974).
- ⁴A. C. Cope, R. K. Bly, E. P. Burrows, O. J. Ceder, E. Ciganek, B. T. Gillis, R. F. Porter und H. E. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2170 (1962).
- ⁵K. H. Maurer, C. Brunnée, G. Kappus, K. Habfast, U. Schröder und P. Schulze, ASTM Committee E. 14, Nineteenth Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA (Mai 1971).
- ⁶B. F. Golding, R. W. Rickards, W. E. Meyer, J. B. Patrick und M. Barber, *Tetrahedron Letters* 3551 (1966).
- ⁷G. Gaudiano, P. Bravo, A. Quilico, B. T. Golding und R. W. Rickards, *Ibid.* 3567 (1966).
- ⁸R. C. Pandey, W. F. German, Y. Nishikawa und K. L. Rinehart, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3738 (1971).
- ⁹K. L. Rinehart, Jr., W. P. Tucker und R. C. Pandey, *Ibid.* **93**, 3747 (1971).
- ¹⁰M. v. Ardenne, K. Steinfelder und R. Tümmeler, *Elektronen-anlagerungs - Massenspektrographie organischer Substanzen*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1971).
- ¹¹K. Heyns, H. F. Grützmacher, H. Scharmann und D. Müller, *Fortschr. Chem. Forsch.* **5**, 448 (1966).
- ¹²G. Schneider und D. Voigt, unveröffentlicht.
- ¹³H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, p. 449. Holden-Day, San Francisco (1967).
- ¹⁴J. Baldas, Qu. N. Porter, L. Cholnoky, J. Szabolcs und B. C. L. Weedon, *Chem. Comm.* 852 (1966).
- ¹⁵P. Brown, Y. Kamano und G. R. Pettit, *Org. Mass. Spectrom.* **6**, 613 (1972).
- ¹⁶K. D. Haegle und D. M. Desiderio, Jr., *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 20 (1974).
- ¹⁷A. C. Cope, U. Axen und E. P. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 4221 (1966).
- ¹⁸K. Dornberger, R. Fügner, G. Bradler und H. Thrum, *J. Antibiot.* **24**, 172 (1971).