



УДК 577.175.19.088.5 : 543.51

ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ФУЗИКОКЦИНА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ,  
ПРОДУЦИРУЕМЫХ ФИТОПАТОГЕНОМ  
*FUSICOCCUM AMYGDALI D.*

Садовская В. Л., Казаков В. С., Ракитин Л. Ю.,  
Муромцев Г. С.

Всесоюзный научно-исследовательский институт  
прикладной молекулярной биологии и генетики, ВАСХНИЛ, Москва

Изучены основные закономерности масс-спектрометрической фрагментации при электронном ударе триметилсилильных производных фузикокина А и родственных соединений, продуцируемых фитопатогеном *Fusicoccum amygdali D.* Предложен способ идентификации фузикокина и его аналогов в культуральной жидкости гриба комбинированным методом газовой хроматографии и масс-спектрометрии триметилсилильных производных, при котором детектирование компонентов смеси осуществляется по нескольким выбранным характеристическим ионам. Метод отличается высокой чувствительностью, селективностью и быстротой проведения анализа.

Фитопатогенный гриб *Fusicoccum amygdali D.*, поражающий косточковые деревья, продуцирует ряд фитотоксинов. Среди них наибольшей биологической активностью обладает фузикокин А (I) —  $\alpha$ -глюкозид трициклического дитерпеноида, карбоциклический скелет агликона которого состоит из восьмичленного и двух пятичленных колец и аналогичен агликоном фитотоксинов офиоболинов и котиленонов [1].

Соединение (I) и ряд его аналогов (II)—(VIII) (табл. 1) были выделены из культуральной жидкости гриба, и их строение установлено в начале 70-х годов группой английских и итальянских ученых [2—8]. В работах этих исследователей широко использовалась масс-спектрометрия электронного удара для структурного анализа как нативных веществ, так и продуктов их химической дегградации и модификации, главным образом ацетатов. Для анализа обычно брались индивидуальные соединения, выделенные из сложной смеси метаболитов гриба. Хотя в настоящее время и разработаны методы выделения главного метаболита — фузикокина А [9, 10], выделение из смесей минорных компонентов представляет значительные трудности. В то же время изучение состава фузикокинов культуральной жидкости в зависимости от условий ферментации (питательная среда, продолжительность) важно для характеристики этой группы физиологически активных веществ и исследования путей образования основных метаболитов.

В настоящей работе для анализа смесей веществ, содержащихся в экстрактах культуральной жидкости гриба *F. amygdali D.* и обладающих фузикокиновой активностью, был использован комбинированный метод газовой хроматографии — масс-спектрометрии (ГХ-МС). Экстрагируемые продукты силилировали и образовавшуюся смесь триметилсилильных производных (TMS) разделяли газовой хроматографией (табл. 2) с последующей идентификацией компонентов масс-спектрометрией при ионизации электронным ударом.

Закономерности фрагментации TMS-производных фузикокинов при действии электронного удара нами изучены на примере тетра-TMS-производного индивидуального образца фузикокина А, масс-спектр которого приведен на рис. 1, а пути распада молекулярного и глюкопиранозного ионов представлены на схемах 1 и 2.

Сокращения: TMS — триметилсилил, ГХ-МС — ГЖХ-масс-спектрометрия.

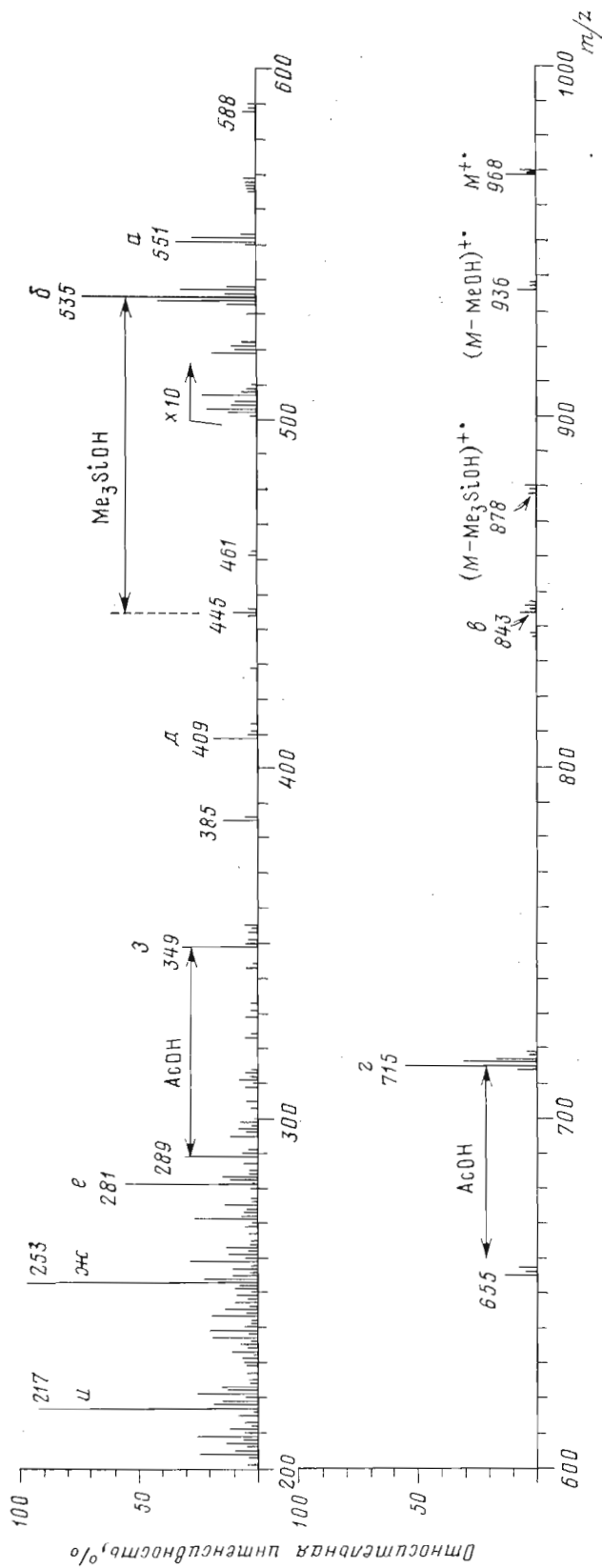
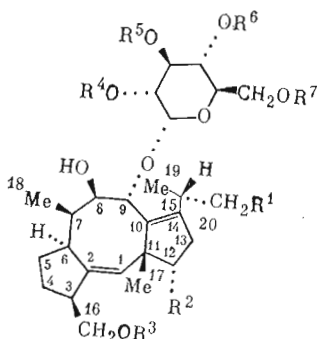


Рис. 1. Масс-спектр ТМС-производного фузикоциана А(1)

Метаболиты фузикококциновой природы, обнаруженные в культуральной жидкости гриба-продуцента *Fusicoccum amygdali* D.



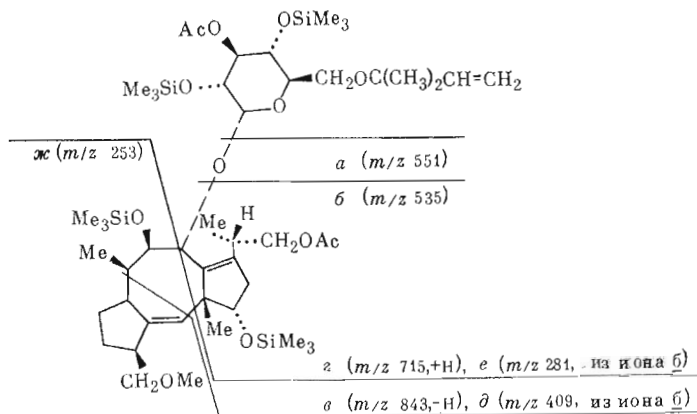
Метаболит	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>
Фузикокоцин А (I)	OAc	OH	Me	H	Ac	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
изо-Фузикокоцин А (II)	OAc	OH	Me	H(Ac)	H	H(Ac)	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
20-Диацетилфузикокоцин А (III)	OH	OH	Me	H	Ac	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
Фузикокоцин С (IV)	OAc	OH	Me	H	H	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
Д (V)	OH	OH	Me	H	H	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
Н (VI)	H	H	H	H	H	H	H
Ж (VII)	H	OH	Me	H	H	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>
16-Деметилфузикокоцин Ж (VIII)	H	OH	H	H	H	H	C(CH <sub>3</sub> )CH=CH <sub>2</sub>

Таблица 2

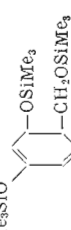
Данные газовой хроматографии TMS-производных фузикококциновых метаболитов (I) – (VIII)

TMS-производное фузикококцина	Время удерживания, мин	Молекулярная масса TMS-производного
(I)	12,2	968
(II)	13,9	968
(III)	10,8	998
(IV)	12,9	998
(V)	11,8	1028
(VI)	9,0	914
(VII)	9,2	940
(VIII)	10,0	998

Схема 1



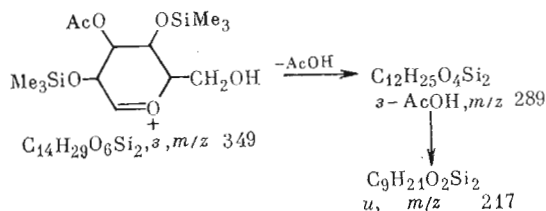
Основные характеристические ионы (относительная интенсивность, %) в масс-спектрах TMS-производных фузикоцинов (I)-(VIII)

Тип иона	Соединение							
	(I)	(II)	(III)	(IV)	(V)	(VI)	(VII)	(VIII)
$M^+$	968 (0,4)	968 (0,3)	998 (0,3)	998 (0,3)	1028 (0,3)	914 (0,4)	940 (0,7)	998 (0,7)
<i>a</i>	551 (3)	551 (2)	581 (1)	551 (4)	581 (4)	463 (5)	493 (8)	551 (3)
<i>b</i>	535 (5)	535 (6)	565 (6)	535 (40)	565 (10)	447 (22)	477 (10)	535 (12)
<i>c</i> или <i>e-1</i>	843 (0,6)	843 (0,8)	873 (0,5)	873 (0,8)	903 (0,8)	731 (0,4)	815 (2,5)	815 (2,5)
<i>g</i> или <i>e+1</i>	715 (4)	715 (2)	745 (2)	745 (2)	775 (3)	603 (2)	687 (4)	687 (3)
<i>d</i>	409 (18)	409 (16)	439 (16)	409 (16)	439 (18)	263 (50)	351 (35)	351 (35)
<i>e</i>	281 (65)	281 (28)	311 (100)	281 (24)	311 (62)	—	223 (30)	223 (30)
<i>ж</i>	253 (100)	253 (100)	253 (70)	253 (85)	253 (45)	311 (22)	253 (85)	311 (65)
<i>з</i>	349 (25)	349 (15)	349 (22)	379 (15)	379 (38)	—	379 (25)	379 (25)
<i>3-AcOH</i>	289 (16)	289 (10)	289 (15)	—	—	—	—	—
<i>3-TMSOH</i>	259 (14)	259 (12)	259 (8)	289 (48)	289 (58)	—	289 (80)	289 (70)
<i>и</i>	217 (25)	217 (3)	217 (15)	217 (18)	217 (15)	217 (55)	217 (20)	217 (20)
$(Me_3SiOCH)_2^+$	—	204 (8)	204 (6)	204 (60)	204 (42)	204 (80)	204 (60)	204 (60)
$Me_3SiOCH=OSiMe_3$ $Me_3SiO$	191 (14)	191 (25)	191 (16)	191 (100)	191 (100)	191 (100)	191 (100)	191 (100)
	—	—	—	—	—	361 (95)	—	—
$Me_3SiO=CH_2^+$	—	—	—	—	—	103 (35)	—	—

Разрыв гликозидной связи в молекулярном ионе соединения (I) приводит к двум агликоновым фрагментам — *a* и *б* (схема 1). Кроме того, в спектре присутствуют ионы (*a* — TMSOH)<sup>+</sup> и (*б* — TMSOH)<sup>+</sup>. Наиболее характерным процессом фрагментации является распад восьмичленного агликонового цикла, который протекает как в молекулярном ионе M<sup>+</sup>, так и в агликоновом заряженном фрагменте *б* (схема 1) и приводит к образованию ионов *в* — *ж*.

Глюкопиранозная часть молекулы характеризуется гликозидным ионом *з*, строение которого аналогично строению соответствующего фрагмента с *m/z* 205 в масс-спектре немодифицированного вещества (I) [10], и фрагментами, образующимися из него (схема 2). Строение ионов, приведенных на схемах 1 и 2, находится в соответствии с элементными составами этих ионов, определяемыми из масс-спектров высокого разрешения.

Схема 2



При ГХ-МС-анализе хлороформных экстрактов проб культуральной жидкости, отобранных в разные сроки культивирования\*, среди метаболитов фузикокиновой природы кроме фузикокина А были обнаружены соединения (II)—(VIII), времена удерживания которых приведены в табл. 2, а данные масс-спектров сведены в табл. 3.

Учитывая тот факт, что принципиальная фрагментация молекулярных ионов фузикокиновых метаболитов должна соответствовать схемам 1 и 2, при сравнении значений массовых чисел ионов *a* — *з* в масс-спектрах TMS-производных соединений (I)—(VIII) можно сделать вывод о количестве, природе и расположении заместителей в агликоновой и глюкопиранозной частях молекулы.

Так, последовательный выброс из молекулярного иона частиц, имеющих 124 и 253 а.е.м., сопровождается образованием ионов типа *в* и *г*, а также иона с *m/z* 253 (фрагмент *ж*), что свидетельствует о наличии в молекулах соединений (I)—(V) и (VIII) MeO-группы в положении 16. Замена этого заместителя на Me<sub>3</sub>SiO-группу приводит к ионам типа *ж* с *m/z* 311, а образование ионов типа *в* и *г* протекает при элиминировании из молекулярного иона соответственно 183 и 311 а.е.м., что и наблюдается в масс-спектрах соединений (VI) (фузикокин Н) и (VIII) (16-диметилфузикокин J).

Массовые числа ионов типа *e* и *д* определяются природой заместителей в правом пятичленном кольце агликона: *m/z* 281 (ион *e*) и *m/z* 409 (ион *д*) наблюдаются при наличии 20-OAc- и 12-OSiMe<sub>3</sub>-заместителей (соединения (I), (II) и (IV)), *m/z* 311 (ион типа *a*) и *m/z* 439 (ион типа *д*) обнаруживаются при наличии Me<sub>3</sub>SiO-заместителей в положениях 12 и 20 (соединения (III) и (V)).

Степень замещенности глюкозного остатка в молекулах метаболитов фузикокина сказывается на массовых числах ионов типа *з*. Так, для соединений (I)—(III), содержащих одну Ac-группу в сахарном остатке, характерна последовательность распадов ди-TMS-содержащего иона *з* (*m/z* 349), изображенная на схеме 2. Для три-TMS-содержащего иона типа *з* (*m/z* 379), встречающегося в масс-спектрах TMS-производных соединений (IV), (V), (VII) и (VIII), типично образование интенсивных ионов

\* Результаты работы по изучению условий биосинтеза фузикокина, выделению фузикокиновых метаболитов и исследованию их физиологической активности будут опубликованы отдельно.

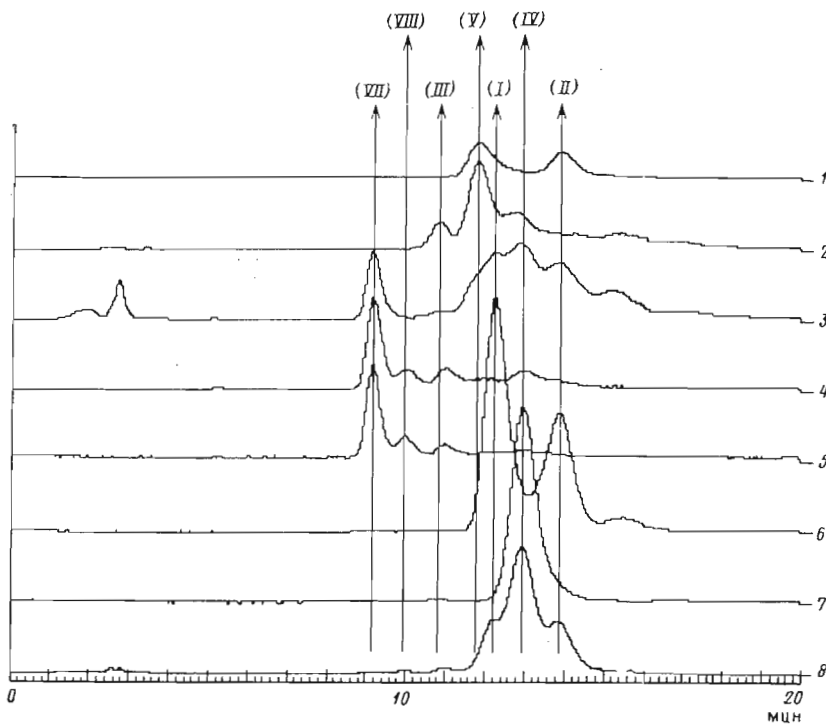
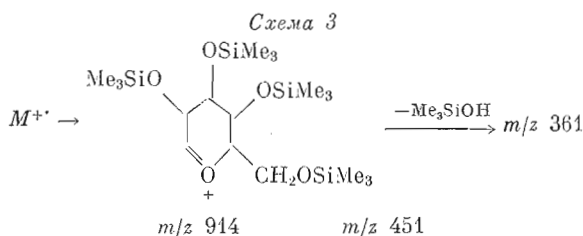


Рис. 2. Масс-фрагментограмма хлороформного экстракта культуральной жидкости *F. amygdali* D. на 6-й день культивирования.  $m/z$ : 1 —  $775 \times 5$ ; 2 —  $565 \times 2$ ; 3 — 477; 4 —  $687 \times 5$ ; 5 —  $815 \times 10$ ; 6 —  $715 \times 1,5$ ; 7 —  $745 \times 2$ ; 8 —  $535 \times 0,2$

с  $m/z$  204 и 191, которое, по-видимому, инициируется вицинальным расположением двух TMS-заместителей [11, 12].

Как видно из табл. 3, масс-спектры соединений (I) и (II) мало отличаются друг от друга, а их хроматографические времена удерживания заметно различны (табл. 2). Эти различия позволяют предположить, что метаболит (II) является изомером фузикокина А, отличающимся расположением заместителей в сахарном остатке. Однако отдать предпочтение изомерным 2-О- или 4-О-ацетильным производным только на основании масс-спектров не представляется возможным.

Особо следует обсудить спектр соединения (VI), на основании которого этому соединению приписано строение фузикокина Н. В спектре доминирует пик с  $m/z$  361, не наблюдаемый в других масс-спектрах (табл. 3). Можно было предположить, что из-за отсутствия в молекуле С-6'-трет-пентенильного заместителя разрыв гликозидной связи в молекулярном ионе приводит к тетра-TMS-содержащему гликозидному иону с  $m/z$  451, интенсивность пика которого в масс-спектре соединения (VI) очень мала. Дальнейшее элиминирование молекулы силанола приводит к иону с  $m/z$  361:



Пики ионов с  $m/z$  451 и 361 были отмечены ранее в масс-спектре пер-триметилсилильного производного глюкозы [11]. Наличие в масс-спектре соединения (VI) пиков ионов  $(\text{CH}_2=\overset{+}{\text{O}}\text{SiMe}_3)$  с  $m/z$  103 и  $(M-103)^+$  подтверждает это предположение. Остальные ионы в спектре соединения (VI)

(табл. 3) соответствуют предложенным схемам фрагментации (схемы 1 и 2) и позволяют идентифицировать соединение (VI) как фузикокин II.

Сопоставляя данные табл. 3, нетрудно заметить, что при идентификации метаболитов фузикокина в смеси их TMS-производных нет необходимости в получении полного масс-спектра, а можно воспользоваться массовыми числами пиков нескольких ключевых фрагментов. Это обстоятельство открывает возможность для применения в аналитических целях метода «масс-фрагментографии», включающего газохроматографическое разделение TMS-производных и детектирование их по одному или нескольким выбираемым ионам. Результат использования этого метода при идентификации метаболитов фузикокина в хлороформном экстракте культуральной жидкости шестого дня ферментации без какой-либо дальнейшей очистки представлен на рис. 2. Для детектирования компонентов смеси были выбраны  $m/z$  следующих характеристических ионов (см. табл. 3): ионы типа *b* с  $m/z$  477, 535 и 565; ион типа *e* с  $m/z$  815, характерный для фузикокина J, и ионы типа *z* с  $m/z$  687, 715, 745 и 775. С применением метода масс-фрагментографии достигается высокая чувствительность и селективность, позволяющие обнаружить минорные метаболиты с близкими хроматографическими параметрами, что затрудняет их идентификацию обычным ГХ-МС-методом. В данной смеси таким путем были выявлены соединения (VIII) ( $m/z$  535, 687 и 815), (III) ( $m/z$  565 и 745) и (V) ( $m/z$  565 и 775). Нижний предел детектирования по двум ионам, определенный нами для индивидуального фузикокина А, составил 1—10 нг.

Таким образом, триметилсилильные производные фузикокинов отличаются легкостью получения, удобством разделения их с помощью газовой хроматографии, а их масс-спектры намного информативнее спектров нативных метаболитов и их ацетатов. Это позволяет успешно использовать комбинированный метод ГХ-МС для идентификации фузикокинов и их аналогов без препаративного выделения.

### Экспериментальная часть

ГХ-МС-анализ проводили на масс-спектрометре М-80 А (Hitachi, Япония), снабженном компьютерной системой обработки данных М-003. Хроматографическое разделение осуществляли на насыпной колонке (1000 × 3 мм) со стационарной фазой OV-1 (2% на Gas Chrom Q, 100—120 меш) при температуре колонки 280° С с предварительным нагревом от 240 до 280° С со скоростью 10° С/мин, температуре инжектора 250° С и температуре сепаратора 250° С. Масс-спектрометрическая идентификация проводилась при электронном ударе по масс-спектрам, полученным в диапазоне 0—1500 а.е.м., а также в режиме детектирования по нескольким выбранным ионам, при температуре ионизационной камеры 200° С и энергии ионизации 70 эВ. Точные измерения массовых чисел производили при разрешающей способности прибора 8000—10 000 (по дублету  $m/z$  78 смеси бензол — пиридин).

Образцы для анализа силилировали добавлением к сухому остатку вещества 10 мкл универсального силилирующего агента (Serva), состоящего из бис(триметилсилил)трифторацетамида, триметилхлорсилана и триметилсилилимидазола в соотношении 3 : 2 : 3, и 40 мкл сухого бензола. Полученный раствор оставляли на 30 мин при 20° С.

Индивидуальный фузикокин А, а также хлороформные экстракты культуральной жидкости из проб, отобранных в различные сроки культивирования, были любезно предоставлены Н. С. Кобриной и В. М. Кореневой (ВНИИПМБиГ), за что авторы выражают им благодарность.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Муромцев Г. С., Герасимова Н. М., Кобрина Н. С., Коренева В. М., Смоляков В. С. Успехи микробиологии, 1984, т. 19, с. 106—135.
2. Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Conlay C., Smale T. V., Thomas R., Waight E. S. Chem. Communs, 1968, p. 1195—1196.
3. Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Ohnsorge U. F. W., Thomas R. Chem. Communs, 1968, v. 1198—1200.

4. Barrow K. D., Chain E. B. *Biochem. J.*, 1969, v. 114(1), p. 4P—5P.
5. Ballio A., Brujani M., Casinovi C. G., Cerrini S., Fedeli W., Pellicciari R., Santurbano B., Vaciago A. *Experientia*, 1968, v. 24, № 6, p. 631—635.
6. Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Ohnsorge U. F. W., Thomas R. J. *J. Chem. Soc. (C)*, 1971, v. 7, p. 1265—1275.
7. Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Ohnsorge U. F. W., Sharma R. P. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1973, v. 15, p. 1590—1599.
8. Barrow K. D., Barton D. H. R., Chain E. B., Bagoonda-Kasujia D., Mellows G. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1975, v. 10, p. 877—883.
9. Ballio A., Carilli A., Santurbano B., Tuttobello L. *Annali della Istituto Superiore di Sanito*, 1968, v. 4, p. 317.
10. Кобринa H. С., Вобликова В. Д. *Химия природ. соединений*, 1980, № 6, с. 792—796.
11. DeJongh D. C., Radford T., Hribar J. D., Hanessian S., Bieber M., Dawson G., Sweeley C. C. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1968, v. 91, p. 1728—1738.
12. Puzo G., Prome J. C. *Biomed. Mass Spectrom.*, 1978, v. 5, № 2, p. 146—152.

Поступила в редакцию  
13.XI.1985

#### GC-MASS SPECTROMETRIC ANALYSIS OF FUSICOCCIN METABOLITES PRODUCED BY PHYTOPATHOGEN *FUSICOCCUM AMYGDALI* D.

SADOVSKAYA V. L., KAZAKOV V. S., RAKITIN L. Yu.,  
MUROMTSEV G. S.

*All-Union Research Institute of Applied Molecular Biology and  
Genetics, VASKHNIL, Moscow*

The main mass-spectrometric fragmentation patterns under electron impact have been studied for trimethylsilyl derivatives of fusicocin A and related compounds produced by the plant pathogen *Fusicoccum amygdali* D. A method for identification of fusicocin metabolites in culture media by combined gas chromatography mass-spectrometry of trimethylsilyl derivatives with multiple ion detection has been developed. The method is characterized by high sensitivity and selectivity and is very rapid.