



УДК 577.182.54'13

© 1991 г.

О. А. Миргородская, Е. Н. Олсуфьева\*, Е. Р. Матвеева,  
А. В. Подтележников

## ИЗУЧЕНИЕ СТРОЕНИЯ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ЭРИАД МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

*Институт аналитического приборостроения НТО АН СССР, Ленинград;  
\* ВНИИ по изысканию новых антибиотиков АМН СССР, Москва*

Впервые в условиях масс-спектрометрии ЭРИАД изучена фрагментация даунорубицина, карминомицина и доксорубицина и их полусинтетических аналогов. В масс-спектрах присутствуют пики протонированных молекулярных ионов ( $M + H$ )<sup>+</sup> и их фрагментов. Результаты сопоставлены с литературными данными, касающимися масс-спектров этих веществ, полученных другими масс-спектрометрическими методами.

Антрациклиновые антибиотики привлекают к себе внимание ввиду их исключительной важности для лечения онкологических заболеваний человека [1].

За 30 лет с момента первого успешного применения в клинике антрациклинового антибиотика даунорубицина (дауномицина, рубомицина) (I) было выделено из природных источников, а также получено путем синтеза более 1000 различных антрациклиновых структур. Некоторые из антибиотиков, например доксорубицин (адриамицин, адриабластин) (II) и карминомицин (III), нашли практическое применение [2]. Исследования по поиску новых более эффективных противоопухолевых препаратов среди соединений этого класса ведутся в настоящее время за рубежом и в нашей стране [3].

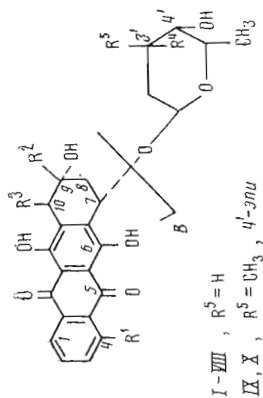
Для доказательства структуры новых антибиотиков антрациклинового ряда применяется весь арсенал традиционных спектральных методов: ИК-, УФ-, ЯМР- и масс-спектрометрии [4].



Масс-спектрометрия с ионизацией электронным ударом (EI MS) давно и широко применяется для изучения строения фрагментов антрациклиновых антибиотиков, особенно их агликоновой части. Однако для характеристики целой молекулы антибиотика-гликозида, и особенно ее углеводной части, метод EI не пригоден из-за лабильности гликозидной связи в условиях получения масс-спектра [1]. Ионизация полевой десорбцией (FD) используется ограниченно [4, 5]. Совсем недавно для ионизации этих веществ стали применять бомбардировку ускоренными атомами (FAB) [6—8]. Однако при этом методе, когда исследуемые соединения помещаются в глицериновую матрицу, получают масс-спектры, в которых присутствуют пики молекулярных ионов с завышенной на несколько атомных единиц величиной  $m/z$  в зависимости от типа антрахинонового фрагмента. Подобное поведение соединений в условиях масс-спектрометрирования с применением глицериновой матрицы связано с восстановлением структур хинонового типа [9].



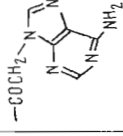
Данное обстоятельство указывает на определенные недостатки метода FAB при нахождении молекулярной массы антибиотиков-гликозидов с антрациклиновым агликоном или каким-нибудь другим хиноном, которые могут приводить к ошибкам при установлении структуры новых соединений данного класса.

Недавно для изучения структуры различных природных соединений [10, 11], в том числе и олигосахаридов [12], был предложен новый масс-

Результаты масс-спектрометрического анализа



Соединение	Мол. масса, M <sub>r</sub>	Ядро, В, M <sub>r</sub>	Заместители				Наблюдаемые ионы, m/z (I, %), тип иона
			R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	
I	527	381	-OCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>3</sub>	H	-NH <sub>2</sub>	528(14) MH <sup>+</sup> , 382(14) BH <sup>+</sup> , 322(100) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(98) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 291(26) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 398(2) (BH+O) <sup>+</sup> , 365(45) (BH-OH) <sup>+</sup> , 348(2) (BH-2OH) <sup>+</sup> , 339(5) (BH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 131(5) (MH-BO) <sup>+</sup>
II	543	397	-OCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>2</sub> OH	H	-NH <sub>2</sub>	544(23) MH <sup>+</sup> , 398(25) BH <sup>+</sup> , 381(12) (BH-OH) <sup>+</sup> , 364(4) (BH-2OH) <sup>+</sup> , 339(12) (BH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 321(100) (BH-R <sup>2</sup> -OH) <sup>+</sup> , 308(41) (BH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 291(15) (BH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> -OH) <sup>+</sup> , 131(6) (MH-BO) <sup>+</sup>
III	513	367	-OH	-COCH <sub>3</sub>	H	-NH <sub>2</sub>	514(11) MH <sup>+</sup> , 368(12) BH <sup>+</sup> , 351(30) (BH-OH) <sup>+</sup> , 349(8) (B-H <sub>2</sub> O) <sup>+</sup> , 324(4) (B-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 308(100) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(98) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , (BH-OH-R <sup>2</sup> -R <sup>3</sup> ) <sup>+</sup> , 181(22)
IV	595	381	-OCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>3</sub>	H		596(75) MH <sup>+</sup> , 382(5) BH <sup>+</sup> , 385(61) (BH-OH) <sup>+</sup> , 348(4) (BH-2OH) <sup>+</sup> , 339(18) (BH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 321(100) (BH-R <sup>2</sup> -OH) <sup>+</sup> , 308(35) (BH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(54) (BH-R <sup>2</sup> -OH-CH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup> , 291(5) (BH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> -OH) <sup>+</sup> , 199(95) (MH-BO) <sup>+</sup>
V	581	367	-OH	-COCH <sub>3</sub>	H		582(72) MH <sup>+</sup> , 351(12) (BH-OH) <sup>+</sup> , 324(15) (B-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 308(100) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(98) (BH-OH-R <sup>2</sup> -R <sup>3</sup> ) <sup>+</sup> , 291(13) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>

Соединение	Моф. масса, $M_r$	Иatro. H, $M_r$	Заместители				Наблюдаемые ионы, $m/z$ ( $I$ , %), тип иона
			R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	
VI	611	397	-OCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>2</sub> OH	H		612(100) MH <sup>+</sup> , 381(5) (BH-OH) <sup>+</sup> , 365(20) (BH-R <sup>1</sup> ) <sup>+</sup> , 349(30) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 322(80) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(83) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>
VII	597	383	-OH	-COCH <sub>2</sub> OH	H		598(28) MH <sup>+</sup> , 351(12) (BH-OH-R <sup>1</sup> ) <sup>+</sup> , 308(100) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , (BH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 291(13) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>
III	660	514	-OCH <sub>3</sub>		H	-NH <sub>2</sub>	661(28) MH <sup>+</sup> , 534(100) (M + Na-Ade-CH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup> , 515(21) BH <sup>+</sup> , 498(85) (BH-OH) <sup>+</sup> , 482(23) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 322(28) (BH-OH-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(28) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 291(33) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>
IX	527	367	-OH	-COCH <sub>3</sub>	H	-NH <sub>2</sub>	528(22) MH <sup>+</sup> , 368(7) BH <sup>+</sup> , 351(6) (BH-OH) <sup>+</sup> , 350(25) (BH-R <sup>1</sup> ) <sup>+</sup> , 349(97) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 334(16) (BH-OH-R <sup>1</sup> ) <sup>+</sup> , 324(7) (B-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 307(100) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup>
X	571	411	-OH	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-COOCH <sub>3</sub>	-NH <sub>2</sub>	572(100) MH <sup>+</sup> , 412(13) BH <sup>+</sup> , 395(48) (BH-OH) <sup>+</sup> , 378(14) (BH-OH-R <sup>1</sup> ) <sup>+</sup> , 352(7) (B-R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 349(36) (BH-OH-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 335(89) (B-R <sup>1</sup> -R <sup>2</sup> ) <sup>+</sup> , 323(21) (B-R <sup>2</sup> -R <sup>3</sup> ) <sup>+</sup>

\* Масс-спектры получены на приборном комплексе ХД-МС 3303, использованные напряжения:  $U_K$  2,8 кВ,  $\Delta U = 600$  В.

спектрометрический метод с экстракцией из растворов ионов при атмосферном давлении — ЭРИАД.

Настоящее исследование посвящено применению метода ЭРИАД для изучения строения природных (I—III), а также полученных ранее полусинтетических антрациклиновых антибиотиков (IV—X) [8, 13], различающихся между собой заместителями в положениях C4, C9, C10, C3' и 3'N (таблица).

Соединения (IV) и (V) — 3'-дезамино-3'-пиперидинопроизводные даунорубицина и карминомицина — получены восстановительным алкилированием соответственно антибиотиков (I) и (III) глutarовым диальдегидом в присутствии цианборгидрида натрия [8]. Их 14-гидроксипроизводные (VI, VII) приготовлены аналогичным путем из соответствующих 14-бромпроизводных, защищенных по 13-C=O-группе диметилкеталем с последующим деблокированием и гидролизом [8]. Соединение (VIII) (14-(аденилил-9)-даунорубицин) образовалось при обработке 14-бромдаунорубицина избытком аденина [13]. Производные, содержащие разветвленный углеводный фрагмент — 4-эпи-ванкозамин (эремозамин) и соответственно агликоны карминомицинон и  $\epsilon$ -родомицинон (IX) и (X), получены методом гликозилирования [14].

Методом ЭРИАД для всех изученных соединений в области масс-спектра, соответствующей молекулярным ионам, получены лишь пики, отвечающие протонированным молекулярным ионам  $(M + H)^+$  (см. таблицу). В то же время в масс-спектре соединения (IV), полученном методом FAB, присутствует группа пиков с  $m/z$  597, 598 и 599, соответствующих квазимолекулярных ионов  $(M + 2H)^+$ ,  $(M + 3H)^+$  и  $(M + 4H)^+$ . Пики протонированных и квазимолекулярных ионов  $(M + H)^+$  и  $(M + 2H)^+$ ,  $(M + 3H)^+$  присутствуют в спектрах соединений (VI), (VII) —  $m/z$  612 и 613, а также 598 и 599, 600 [8]. Спектр соединения (VIII) содержит пик молекулярного иона  $(M)^+$  и ионов  $(M + H)^+$ ,  $(M + 2H)^+$  с  $m/z$  600 и 661, 662 [13].

Наибольшую устойчивость в условиях масс-спектрометрии ЭРИАД гликозидной связи (по отношению к другим типам связей каждого конкретного соединения) обнаружили соединения, содержащие пиперидильный заместитель в положении 3' углеводного фрагмента ((IV) (VI)), а также соединение с метоксикарбонильной группой при C10 (X).

При расщеплении гликозидной связи в условиях масс-спектрометрирования природные антибиотики (I—III) и подавляющее большинство производных (IV), (IX), (X) образовывали ион, соответствующий агликоновому фрагменту  $BH^+$  невысокой интенсивности (< 25%) его пика в масс-спектре. Такой тип распада характерен для этих соединений при EI и FD [1].

В случае соединений (V—VII) вместо фрагмента  $BH^+$  образовывался ион, соответствующий более высокой степени деструкции агликона  $(BH-OH-R^2)^+$ , интенсивность которого в масс-спектре превосходит 80%. Пик этого фрагмента с высокой интенсивностью (лишь для масс-спектра соединения (VIII) его интенсивность равна 28%) очень характерен для масс-спектров ЭРИАД большинства изученных нами соединений (I—VIII) и типичен для масс-спектров агликонов-антрациклинонов, полученных методом EI [1, 15].

Однако для соединений с объемным заместителем (аденином) при C14 (VIII), а также соединений с разветвленным углеводным фрагментом ((IX) и (X)) этот тип фрагментации не наблюдался. В условиях масс-спектрометрии ЭРИАД для соединений (VIII—X) более характерна фрагментация, приводящая к ионам  $(B-R^1-R^3)^+$  с интенсивностями пиков 28, 97 и 89% соответственно. В масс-спектрах всех соединений, кроме (VII), присутствует пик фрагмента  $(BH-OH)^+$  невысокой или средней интенсивности (для соединений (I—VI), (IX), (X) 6—61%) и высокой интенсивности (85%) в случае соединения с объемным заместителем (аденином) при C14 (VIII).

Для масс-спектров большинства соединений (I—IX) характерен достаточно интенсивный пик иона  $(B-R^1-R^2)^+$ , соответствующего отщеп-

лению заместителей одновременно от C4 и C9 агликона. В спектре соединения (X) имеется пик иона  $(\text{BH}-\text{OH}-\text{R}^1-\text{R}^2)^+$ , интенсивность которого равна 36%.

Помимо рассмотренных фрагментов в масс-спектрах изученных соединений имеется еще ряд пиков ионов, образование которых является индивидуальной характеристикой каждого из изученных соединений, таких, как  $(\text{BH}-2\text{OH})^+$ ,  $(\text{B}-\text{R}^2)^+$ ,  $(\text{BH}-\text{OH}-\text{R}^2-\text{R}^3)^+$  и т. д.

Фрагменты  $(\text{MH}-\text{BO})^+$ , соответствующие углеводному остатку, обнаружены лишь в масс-спектрах (I), (II) и (IV) и имеют интенсивность 5, 6 и 95% соответственно. В случае соединения (VIII) отмечен интенсивный пик с  $m/z$  534, соответствующий фрагменту  $(\text{M}+\text{Na}-\text{Ade}-\text{CH}_3)^+$ , характерному для моно- и дисахаридов [12].

Таким образом, масс-спектрометрия ЭРИАД может быть успешно использована для изучения строения гликозидов, содержащих агликоны-антрациклины.

Приносим благодарность Б. В. Розынову, руководителю группы масс-спектрометрических исследований Института биорганической химии им. М. М. Шемякина, за ценные замечания при подготовке статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bouma J., Beijnen J. H., Bult A., Underberg W. J. M. // Pharm. Weekbl. Sci. Ed. // 1986. V. 8. № 2. P. 109—133.
2. Противоопухолевая химиотерапия / Ред. Переводчикова Н. И. М.: Медицина, 1986.
3. Олсуфьева Е. Н. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1445—1464.
4. Acton E. M., Tong G. L., Mosher C. W., Wolgemuth R. L. // J. Med. Chem. 1984. V. 27. P. 638—645.
5. Giogia B., Arlandini E., Vigevani A. // Biomed. Mass Spectrom. 1984. V. 11. P. 35—40.
6. Dass G., Seshadri R., Israel M., Desiderio D. M. // Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1988. V. 17. P. 37—45.
7. Олсуфьева Е. Н., Тодорова Н. П., Ярцева И. В., Розынов Б. В., Преображенская М. Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 11. С. 1569—1572.
8. Олсуфьева Е. Н., Розынов Б. В. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 856—862.
9. Ishihara Y., Kunikatsu S., Sano H. // J. Antibiotics. 1989. V. 42. № 1. P. 49—53.
10. Миргородская О. А. // Тез. докл. I Всесоюз. школы-семинара «Применение масс-спектрометрии в биологии и медицине». Харьков, 1989. С. 15—18.
11. Александров М. Л., Барам Г. И., Галль Л. Н., Краснов Н. В., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Николаев В. И., Шкурое В. А. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 5. С. 700—704.
12. Александров М. Л., Безукладников П. В., Грачев М. А., Елякова Л. А., Заягичева Т. Н., Кондратьев В. М., Куснер Ю. С., Миргородская О. А., Фридлянский Г. В. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 12. С. 1689—1692.
13. Олсуфьева Е. Н., Леонтьева О. В., Розынов Б. В., Макухо Л. В. // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т. 36. № 1. С. 8—11.
14. Олсуфьева Е. Н., Бакиновский Л. В., Преображенская М. Н., Де Клерк Э., Бальзарини Я. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 548—555.
15. Олсуфьева Е. Н., Александрова Л. Г., Розынов Б. В., Потапова Н. П., Рубашева Л. М., Поваров Л. С. // Антибиотики и химиотерапия. 1988. Т. 33. № 10. С. 729—735.

Поступила в редакцию  
21.V.1990

O. A. MIRGORODSKAYA, E. N. OLSUFYEVA\*, E. R. MATWEEVA, \*A. V. PODTELEZHNIKOV  
MASS SPECTROMETRY METHOD ERIAD IN THE STRUCTURAL STUDY  
OF ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS

*Institute of Analytical Instrumentation, Academy of Sciences of the USSR, Leningrad,  
\*Institute of New Antibiotics, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow*

Fragmentation of antibiotics daunorubicin, carminomycin, doxorubicin and their semisynthetic analogues under conditions of the new mass spectrometry method ERIAD is discussed. Signals of protonated molecular ion  $(\text{M}+\text{H})^+$  and ions of fragments are present in all the mass spectra. The results are compared with literary data obtained by means of other (EI and FAB MS) mass spectrometry methods.