

УДК 577.1

Дериватизация аминогликозидных антибиотиков трис(2,6-диметоксифенил)метилием

А. П. Топольян¹, М. А. Беляева¹, Е. Е. Быков², П. В. Кудан³, Е. А. Рогожин^{1,2},
Д. А. Стрижевская¹, О. М. Иванова¹, А. В. Устинов¹, И. В. Михура¹, И. А. Прохоренко^{1,2},
В. А. Коршун^{1,2}, А. А. Формановский^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 11

³Федеральный исследовательский центр питания и биотехнологии, 109240, Москва, Устьинский пр., 4/14

*E-mail: formanovsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.01.2016

Принята к печати 20.04.2016

РЕФЕРАТ Детекция аминогликозидных антибиотиков как методами масс-спектрометрии, так и высокоэффективной жидкостной хроматографии представляет серьезную проблему, поскольку а) углеводная природа молекул снижает их способность к ионизации по сравнению с другими органическими молекулами, особенно в методе МАЛДИ-МС; б) отсутствие в молекулах ароматических фрагментов и амидных связей делает невозможным применение обычных УФ-детекторов в ВЭЖХ. Разработанный нами ранее подход для дериватизации аминов с использованием трис(диметоксифенил)метилиевых солей успешно применен для селективной модификации аминогликозидных антибиотиков. Модификация происходит по аминогруппе при первичном атоме углерода; присоединяемый остаток имеет ароматическую природу и несет перманентный положительный заряд, что позволяет легко детектировать аминогликозидные антибиотики методами масс-спектрометрии и обращенно-фазовой ВЭЖХ как в индивидуальном виде, так и в смесях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аминогликозидные антибиотики, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, тритильный катион.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ-МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия; ИФА – иммуноферментный анализ; МАЛДИ-МС (MALDI MS) – масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией; НСМО (LUMO) – низшая свободная молекулярная орбиталь; ТСХ – тонкослойная хроматография; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; СНСА – 1-циано-*n*-гидроксикоричная кислота; DMSO – диметилсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Аминогликозиды представляют собой класс бактерицидных антибиотиков (преимущественно активных в отношении аэробной грамотрицательной микрофлоры, высокоэффективных при большинстве тяжелых инфекций (туберкулез, эндокардит, сепсис)) [1]. Действие аминогликозидов не зависит от фазы размножения микроорганизма, они необратимо связываются с белками 30S субъединицы бактериальных рибосом, нарушая тем самым синтез белка в них. Однако необходимость аэробных условий делает их применение менее эффективным в плохо снабжаемых кровью и омертвевших тканях. Еще одним фактором, влияющим на бактерицидную активность

аминогликозидов, оказывается рН среды – в кислой и нейтральной средах они менее эффективны, чем в слабощелочной среде. Главным недостатком этой группы лекарств является их высокая ото- и нефротоксичность [2, 3] по сравнению с другими антибиотиками, что требует проведения постоянного контроля их содержания не только в биологических жидкостях, но и в продуктах питания животного происхождения. За несколько десятилетий использования этих антибиотиков в клинической медицине разработано большое число лабораторных методов детекции аминогликозидов (с использованием ГХ-МС, ВЭЖХ, в том числе с дериватизацией, ИФА, капиллярного электрофореза и т.п.). Совсем недавно опубликованы

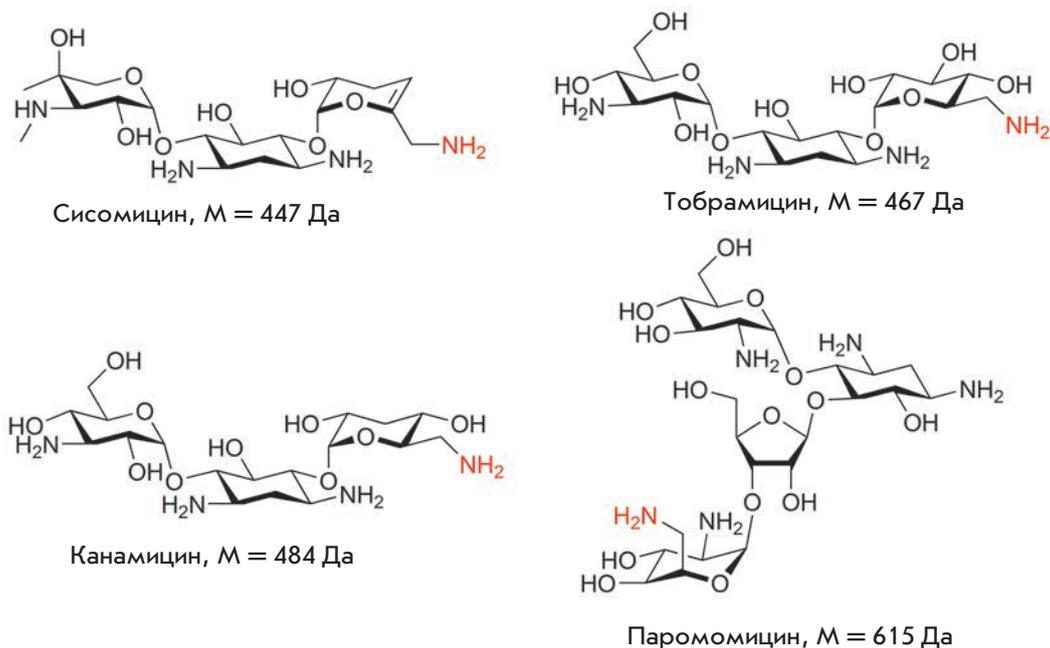


Рис. 1. Примеры структур аминогликозидных антибиотиков

два достаточно подробных обзора по этой тематике [4, 5]. Большое число публикаций [6–18] свидетельствует об актуальности проблемы и необходимости поиска удобных, простых и быстрых процедур, поскольку большинство существующих оказываются либо трудоемкими и долгими, либо предполагают использование дорогостоящих реагентов.

Молекулы аминогликозидных антибиотиков, как правило, содержат несколько аминогрупп (рис. 1). Помимо аминогрупп, непосредственно связанных с гетероциклом или алициклом, молекулы содержат аминогруппы, связанные с первичным атомом углерода (выделены красным цветом). Другая особенность аминогликозидов – прозрачность их растворов в УФ-диапазоне, поскольку в их молекулах отсутствуют сопряженные связи или ароматические фрагменты. Поэтому их невозможно анализировать с помощью ВЭЖХ с УФ-детектором. Обилие гидроксильных групп и аминогрупп, способных образовывать водородные связи, затрудняет высвобождение индивидуальных молекул, что сильно снижает эффективность ионизации аминогликозидов в масс-спектрометрии, например, по сравнению с пептидами близкой массы. Кроме того, обнаружение аминогликозидов в МАЛДИ масс-спектрометрии может осложняться попаданием сигналов вещества в область «шумов» матрицы.

Недавно нами был разработан мягкий метод дериватизации низкомолекулярных аминов реакцией

с катионом трис(2,6-диметоксифенил)метилия **1** [19]. Образующиеся производные 9,10-дизамещенного акридиниевого катиона (Q^+-R) обладают перманентным положительным зарядом (рис. 2). В результате дериватизации происходит также увеличение массы молекулы на постоянную величину (инкремент массы +359 Да), что позволяет успешно детектировать методом масс-спектрометрии МАЛДИ амины даже самой малой массы [19]. В то же время модификация гидрофильных алифатических молекул гидрофобным ароматическим катионом Q^+ может иметь перспективы с точки зрения обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детекцией.

Представляло интерес выяснить применимость этого метода для определения данного класса лекарственных препаратов. В настоящей работе представлен качественный метод обнаружения дериватизи-

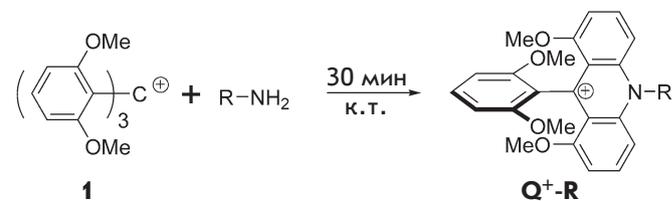


Рис. 2. Общая схема метода дериватизации аминов с использованием трис(2,6-диметоксифенил)метилевых солей (тетрафторбората или гексафторфосфата)

рованных неотщепляемой масс-спектрометрической меткой аминокликозидных антибиотиков с помощью масс-спектрометрии и ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали следующие растворители: диметилсульфоксид, ацетонитрил (Panreac), остальные растворители – отечественного производства («Химмед» и «ЭКОС-1») квалификации «х. ч.» (гексан, метанол, дихлорметан, этилацетат, хлороформ, этанол) и «ос. ч.» (толуол, ацетон). Дихлорметан перегоняли над гидридом кальция, ДМФА перегоняли над гидридом кальция в вакууме и хранили над молекулярными ситами 3Å. Реактивы и сорбенты: триэтиламин, 1,3-диметоксибензол, *n*-бутиламин (Sigma-Aldrich-Fluka, США), аминокликозидные антибиотики канамицин (ОАО «Биохимик», г. Саранск, Россия), сисомицин, тобрамицин, паромомицин (Минхимпром СССР), алюминиевые пластины для тонкослойной хроматографии со слоем силикагеля (Kieselgel 60 F₂₅₄) или оксида алюминия, силикагель и оксид алюминия (активность I) для колоночной хроматографии (Merck, США).

Оборудование и условия

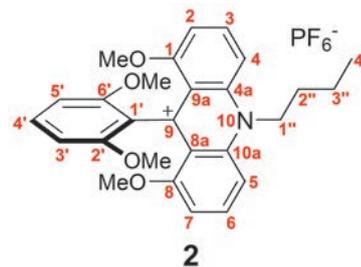
1D и 2D (COSY, HMBSC, HSQC) спектры ЯМР регистрировали при 500 МГц (¹H), 125.7 МГц (¹³C) на спектрометре Bruker AC-500. Спектры калиброваны по остаточным сигналам протонов растворителя, DMSO-*d*₆ (δ_H 2.50 м.д. и δ_C 39.7 м.д.) или CD₃CN (δ_H 1.94 м.д. для ¹H и δ_C 1.32 м.д.); химические сдвиги приведены относительно SiMe₄ (¹H и ¹³C). Визуализацию ТСХ-пластин проводили с помощью ультрафиолетовой лампы при 254 и 360 нм. Масс-спектры регистрировали с использованием времяпролетного масс-анализатора Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенного азотным лазером (длина волны 337 нм), работающим при частоте 50 Гц в режиме регистрации положительно заряженных ионов с применением рефлектрона. Анализ и препаративное разделение модифицированных аминокликозидных антибиотиков проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила на хроматографе Agilent Technologies 1200 Series на обращенно-фазовой колонке Synergi Polar RP (4.5 × 250 мм) в следующих условиях: скорость потока 0.9 мл/мин, 15–50% 80% MeCN + 0.1% TFA за 30 мин, 50–70% за 20 мин, 70–90% за 10 мин, 90% за 5 мин, изократич. в течение 5 мин. Поглощение определяли при 285 нм. Анализ конверсии соединения (1) в соединение (2) проводили с помощью ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила на хроматографе Agilent 1100 Series с мульт-

тиволным детектором на основе диодной матрицы на обращенно-фазовой колонке Symmetry C₈, Waters в следующих условиях: скорость потока 1 мл/мин, градиент ацетонитрила – от 50 до 70% за 20 мин, от 70 до 98% за 10 мин.

Для проведения дериватизации, растворения аналитов и матричных соединений использовали ацетонитрил (HPLC-grade, J.T. Baker), метанол (HPLCgrade, Merck), хлороформ (HPLC-grade, Merck), ультрачистую воду типа I, полученную с использованием системы Milli-Q (Millipore). В качестве матриц применяли 2,5-дигидроксibenзойную, синапиновую и 1-циано-4-гидроксикоричную кислоты (раствор 20 мг/мл в ацетонитриле с добавкой 0.1% трифторуксусной кислоты). Раствор образца (0.5 мкл) в смеси с раствором матрицы (0.5 мкл) наносили в лунку стальной мишени (MTP 384 massive target gold plate T, Bruker Daltonics, Германия) и высушивали на воздухе.

Гексафторфосфат трис(2,6-диметоксифенил)-карбения (1) [20–22]

К раствору 1,3-диметоксибензола (10.0 г, 72.4 ммоль) в 100 мл тетрагидрофурана при перемешивании в атмосфере аргона и охлаждении до –20°C прибавляли по каплям 2.5 М раствор *n*-бутиллития (30 мл, 76 ммоль). Через 1 ч медленно добавляли раствор диэтилкарбоната (2.85 г, 24 ммоль) в тетрагидрофуране (10 мл) и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 сут. Растворитель удаляли при пониженном давлении. К остатку при перемешивании добавляли 200 мл диэтилового эфира, 50 мл дихлорметана и 30 мл HPF₆. Через 3 ч растворитель удаляли при пониженном давлении, затирали в 300 мл диэтилового эфира и отделяли выпавшие фиолетовые кристаллы. Получали 31.0 г (76%) соединения 1. ¹H-ЯМР-спектр (CD₃CN, δ_H, м.д.): 3.55 (м, 18H, OCH₃), 6.61 (6д, 6H, J 8.54 Гц), 7.63 (3т, 3H, J 8.54 Гц). Масс-спектр (МАЛДИ, m/z, CHCA): 423.15.



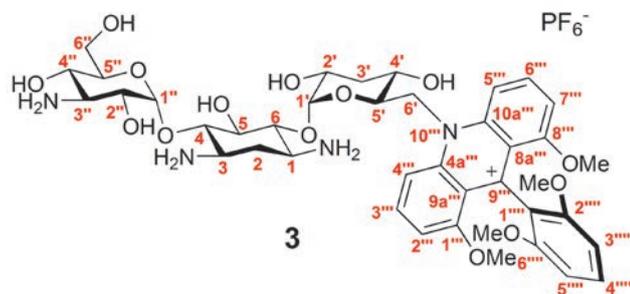
Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(бутил)акридиния (2)

К раствору гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия (1) (1.0 г, 1.76 ммоль) в ацетонитриле (15 мл) при перемешивании при комнатной темпе-

ратуре в атмосфере аргона добавляли *n*-бутиламин (350 мкл, 3.52 ммоль). Цвет раствора изменялся от фиолетового к красному. Через 1 ч растворитель удаляли при пониженном давлении, твердый осадок затирали в диэтиловом эфире, образовавшийся красный осадок отфильтровывали и сушили в эксикаторе при пониженном давлении. Получали 1.0 г соединения **2** (98%). ¹H-ЯМР-спектр (CD₃CN, δ_H, м. д.): 1.15 (т, 3H, *J* 7.3 Гц, H-4"), 1.73–1.80 (м, 2H, H-3"), 2.16–2.22 (м, 2H, H-2"), 3.57 (с, 6H, OCH₃), 3.59 (с, 6H, OCH₃), 5.06–5.09 (м, 2H, H-1"), 6.81 (д, 2H, *J* 8.5 Гц, H-3', H-5'), 7.12 (д, 2H, *J* 8.2 Гц, H-2, H-7), 7.45–7.48 (м, 1H, H-4'), 7.93 (д, 2H, *J* 9.2 Гц, H-4, H-5), 8.20–8.24 (м, 2H, H-3, H-6). ¹³C-ЯМР-спектр (CD₃CN, δ_C, м. д.): 12.96 (4"), 19.61 (3"), 29.52 (2"), 52.37 (1"), 55.64 (OCH₃), 56.76 (OCH₃), 103.74 (3', 5'), 106.50 (2, 7), 109.26 (4, 5), 119.67 (1'), 119.89 (9), 129.40 (4'), 139.87 (3, 6), 141.61 (1, 8), 155.79 (2', 6'), 157.18 (8a, 9a), 160.58 (4a, 10a). Масс-спектр (МАЛДИ, *m/z*, CHSA): 432.30.

Общая методика получения конъюгатов гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)-метилия с аминокуглеводами (аминоглюцитолом, тобрамицином, паромомицином, сисомицином)

К 150 мкл 0.5 × 10⁻² М раствора гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия в ацетонитриле добавляли 1 экв. соответствующего аминокуглевода в 200 мкл карбонатного буфера (рН 9.55). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. Анализ конъюгатов проводили прямо из реакционной смеси без дополнительной очистки.



Гексафторфосфат 1,8-диметокси-9-(2,6-диметоксифенил)-10-(6'-дезаканамицин-6'-ил)-акридиния (3)

К раствору сульфата канамицина (7.8 мг, 0.015 ммоль) в 2 мл буферного раствора (рН 9.55) при перемешивании добавляли 2.8 мг (0.005 ммоль) гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия (**1**) в ацетонитриле. Реакционную смесь выдерживали в течение 30 мин и очищали с помощью препаративной ВЭЖХ. Получали 10.9 мг соединения (**3**) (74%). ¹H-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ_H, м. д.): 1.69–1.72 (м, 1H, H-2), 2.31–2.33 (м, 1H, H-2), 3.17–3.22 (м, 1H, H-3"),

3.36 (м, 1H, H-2'), 3.38 (м, 1H, H-1/H-3), 3.40 (м, 1H, H-4'), 3.45 (м, 1H, H-1/H-3), 3.48 (м, 3H, OCH₃), 3.50 (м, 6H, OCH₃), 3.51 (м, 1H, H-3'), 3.52 (м, 1H, H-6"), 3.53 (м, 1H, H-4"), 3.56 (м, 3H, OCH₃), 3.57 (м, 1H, H4/6), 3.60 (м, 1H, H-6"), 3.66 (м, 1H, H4/6), 3.68 (м, 1H, H-2"), 3.73 (м, 1H, H-5), 3.76 (м, 1H, H-5"), 4.57–4.60 (м, 1H, H-5'), 4.74 (с, 1H, OH), 5.03 (д, *J* 3.7 Гц, 1H, H-1"), 5.26 (с, 1H, OH), 5.32 (м, 1H, H-1'), 5.35 (м, 1H, H-6'), 5.55 (м, 1H, H-6'), 6.49 (м, 1H, OH), 6.79–6.83 (м, 2H, H-3''', H-5'''), 6.91 (с, 1H, OH), 7.17 (м, 1H, H-2'''), 7.20 (м, 1H, H-7'''), 7.42–7.45 (т, 1H, *J* 8.5 Гц, H-4'''), 8.18 (м, 1H, H-3'''), 8.19 (м, 1H, H-6'''), 8.33–8.35 (м, 1H, H-5'''), 8.45 (м, 1H, H-4'''). ¹³C-ЯМР-спектр (DMSO-*d*₆, δ_C, м. д.): 27.48 (2), 46.78 (1/3), 49.28 (1/3), 53.34 (6'), 55.32 (3'), 55.87 (OCH₃), 57.06 (OCH₃), 59.49 (6''), 65.28 (4'), 68.39 (2''), 70.49 (5'), 70.94 (5), 70.98 (2'), 72.33 (4'), 72.58 (3'), 73.08 (5''), 80.33 (6/4), 83.46 (4/6), 95.66 (1'), 99.28 (1''), 103.57 (3'''/5'''), 103.79 (3'''/5'''), 106.50 (2''), 106.75 (7'''), 110.78 (5'''), 111.12 (4'''), 117.60 (1'''), 119.21 (2'''/6'''), 119.30 (2'''/6'''), 129.19 (4'''), 139.08 (3'''), 139.68 (6'''), 142.32 (1'''/8'''), 143.00 (8'''/1'''), 155.65 (9'''), 156.39 (10a'''/4a'''), 158.37 (9a'''/8a'''), 159.63 (8a'''/9a'''), 159.70 (4a'''/10a'''). Масс-спектр (МАЛДИ, *m/z*, CHSA): 843.67.

Методика дериватизации смеси антибиотиков

Смешали по 10 мкл 0.005 М растворов каждого антибиотика (канамицина, сисомицина, тобрамицина и паромомицина) в карбонатном буфере (рН 9.55). К полученному раствору добавили 100 мкл карбонатного буфера (рН 9.55) и 50 мкл 0.005 М раствора соли **1** в ацетонитриле. Пробы для анализа отбирали прямо из реакционной смеси.

Экспериментальная оценка значения рK_{R+} соединения 2 [21, 22]

Для оценки значения рK_{R+} соединения **2** был приготовлен ряд растворов в смеси H₂O/ DMSO/Bu₄NOH с различным содержанием DMSO при постоянной концентрации вещества. Стоковый раствор исходного соединения добавляли непосредственно перед спектрофотометрическими измерениями. В сильно-основных условиях в системе присутствуют как карбокатион R⁺, так и его неионизированная форма в виде соответствующего тританола ROH, имеющие максимальное поглощение при различных длинах волн. Полученные значения оптической плотности в области максимального поглощения карбокатиона (λ = 289 нм) использовали для расчета соотношения [R⁺]/[ROH]. Для определения значения рK_{R+} были построены зависимости log([R⁺]/[ROH]) от функций основности H₋ и C₋, значения которых в каждом растворе определяются мольным содержанием DMSO. С учетом погрешности измерений полученное значение рK_{R+} составляет 18.1 ± 0.5.

Квантово-химические расчеты

Структуры участников модельного механизма превращений рассчитывали посредством программного пакета Gaussian-09 [23] полуэмпирическим методом PM3 с полной оптимизацией геометрических параметров молекул реагентов и продуктов. Последующее вычисление частот нормальных колебаний по стандартной процедуре пакета Gaussian-09 показало, что рассчитанные структуры отвечают критериям стационарной точки (минимумы и седловые точки ППЭ). Результаты расчетов визуализировали при помощи программы ChemCraft [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью определения оптимальных условий функционализации аминов была изучена реакция гексафторфосфата трис(2,6-диметоксифенил)метилия **1** с *n*-бутиламином (рис. 3).

Установлено, что при избытке амина полная конверсия исходного субстрата **1** в единственный продукт **2** завершается уже при комнатной температуре в течение 10 мин в ацетонитриле. Полнота превращения легко контролируется обычной ОФ-ВЭЖХ, поскольку соединение **2** поглощает свет в УФ-диапазоне (рис. 4). Реакция не требует каких-либо специальных условий.

Структура аддукта **2** была подтверждена с помощью 1D и 2D ЯМР-спектроскопии с полным отнесением сигналов в спектрах ЯМР ¹H и ¹³C (см. «Экспериментальную часть»). Механизм образования вещества **2**, по-видимому, включает ипсо-атаку аминогруппы в ортоположение одного из бензольных колец с последующим элиминированием метокси-группы в виде метанола и повторным нуклеофильным замещением во второе кольцо [21].

В сильнощелочной среде окрашенный катион **2** способен присоединять гидроксид-анион и переходить в бесцветный тританол. Один из параметров для оценки стабильности карбокатиона – величина pK_{R^+} , физический смысл которой заключается в значении pH, при котором равны концентрации катионной (окрашенной) и неокрашенной формы. Для соединения **2** экспериментальная оценка дает значение $pK_{R^+} \approx 18$, что свидетельствует об исключительно высокой стабильности катиона: даже в слабощелочных условиях доля катионной формы составляет 100%.

Квантово-химический расчет полуэмпирическим методом PM3 показывает, что для катиона **1** характерна структура пропеллерного типа (рис. 5А). Рассчитанная геометрическая конфигурация катиона **2** (на примере Q^+-Et) характеризуется ярко выраженным выведением диметоксифенильной

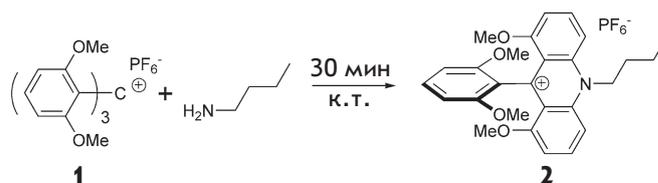


Рис. 3. Схема реакции катиона **1** с *n*-бутиламином

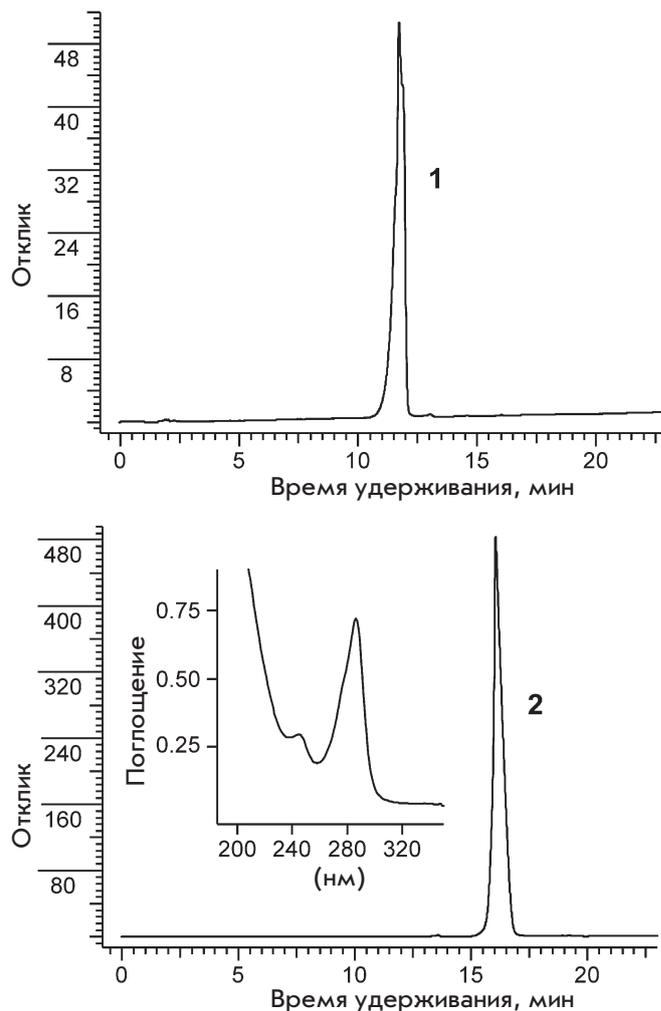


Рис. 4. Профиль ОФ-ВЭЖХ исходного соединения **1** (верхний) и реакционной смеси с **1** с *n*-бутиламином (нижний). Условия – в «Экспериментальной части». На врезке – спектр поглощения вещества **2**

группы в плоскость, ортогональную акридиновому фрагменту, и высокой симметрией (рис. 5Б).

Также были оценены формальные заряды, которые составляют 0.324 на С-атоме и 0.300 на N-атоме центрального кольца акридинового фрагмента. С этим распределением зарядов совпадает и рассчитанная плотность HСМО-орбитали на тех же ато-

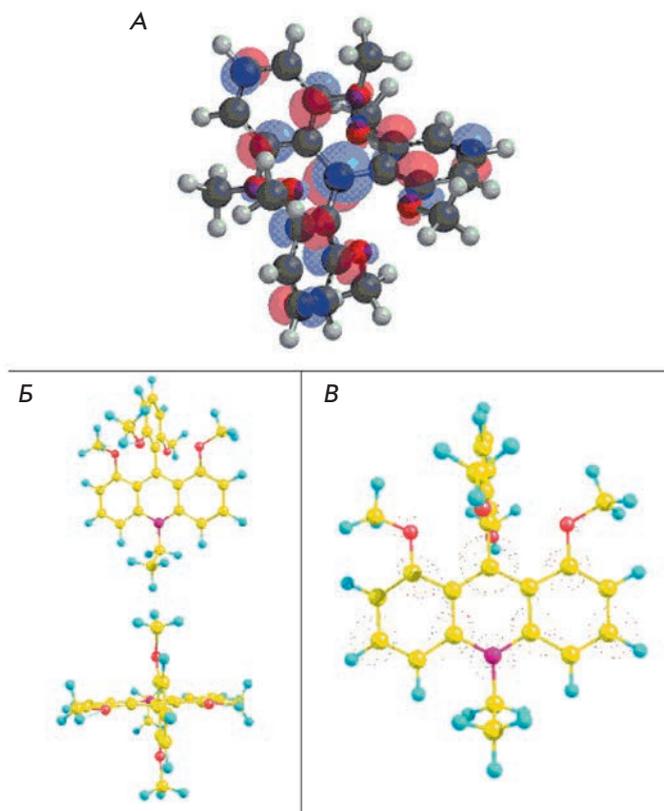


Рис. 5. Рассчитанные методом РМЗ – конфигурация НСМО-орбитали исходного гексаметоксирильного карбокатиона (А); 3D-структура катиона Q⁺-Et (Б); конфигурация НСМО-орбитали катиона Q⁺-R (В). Б и В – атомы углерода показаны желтым цветом, кислорода – красным, азота – розовым, водорода – бирюзовым

мах (рис. 5В). Таким образом, положительный заряд в большей степени локализован на центральном атоме углерода и резонансная структура 2а лучше отражает строение веществ типа Q⁺-R (рис. 6).

Затем была изучена дериватизация простейшего аминокглевода, аминоклюцитол. Аминоклюцитол в свободном виде невозможно определить методом масс-спектрометрии МАЛДИ из-за небольшой молекулярной массы (181 Да) и затрудненной ионизуемости молекулы. Контролируя методом ТСХ исчезновение пятна исходного аминспирта при действии на него избытка дериватирующего агента, установлено, что реакция проходит за 30 мин при комнатной температуре, и в спектре МАЛДИ-МС виден четкий сигнал, соответствующий ожидаемой массе конъюгата (рис. 7).

Для изучения возможности аналогичной дериватизации аминоклюцитолных антибиотиков мы выбрали канамицин, сисомидин, паромомидин, тобрамицин

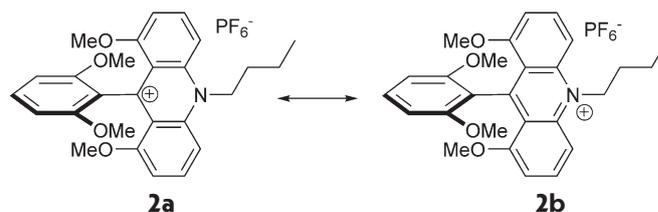


Рис. 6. Резонансные структуры соединения 2

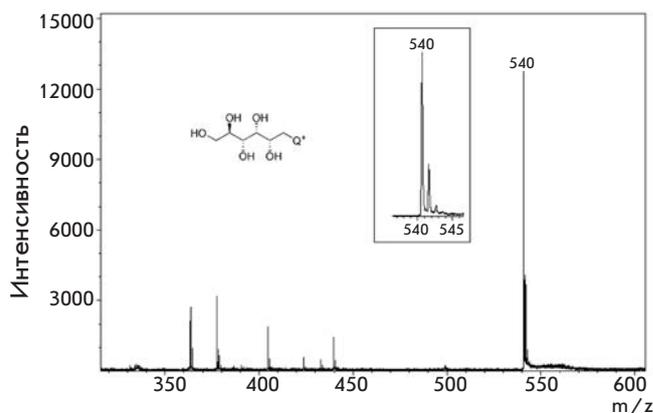


Рис. 7. Масс-спектр МАЛДИ конъюгата 1 с аминоклюцитолом (матрица – синапиновая кислота)

(рис. 1). Поскольку коммерчески доступный препарат канамицина выпускается в форме сульфата канамицина, образец был растворен в карбонатном буфере (рН 9.55). Как и в случае с *n*-бутиламином, реакция идет практически с полной конверсией (рис. 8).

Особенностью строения исследуемых аминоклюцитолов является присутствие нескольких аминоклюцитолов, и модификация может проходить по любой из них. Однако реакция протекает гладко и дает один основной продукт (рис. 8), который был выделен препаративно методом ОФ-ВЭЖХ. Анализ 2D ЯМР-спектров вещества 3 показал, что дериватизация проходит селективно по аминоклюцитолу первичного атома углерода (см. «Экспериментальную часть»). По-видимому, это связано с более высокой стерической доступностью этой аминоклюцитолу по сравнению с аминоклюцитолу, непосредственно связанными с атомами углерода шестичленных циклов и экранированными соседними гидроксильными группами.

Продукт дериватизации легко детектируется масс-спектрометрически: при нанесении в ячейку мишени масс-спектрометра 2×10^{-12} моль конъюгата 3 в спектре МАЛДИ-МС (рис. 9) наблюдается соответствующий сигналу вещества отчетливый пик с высоким соотношением сигнал/шум. Стоит отме-

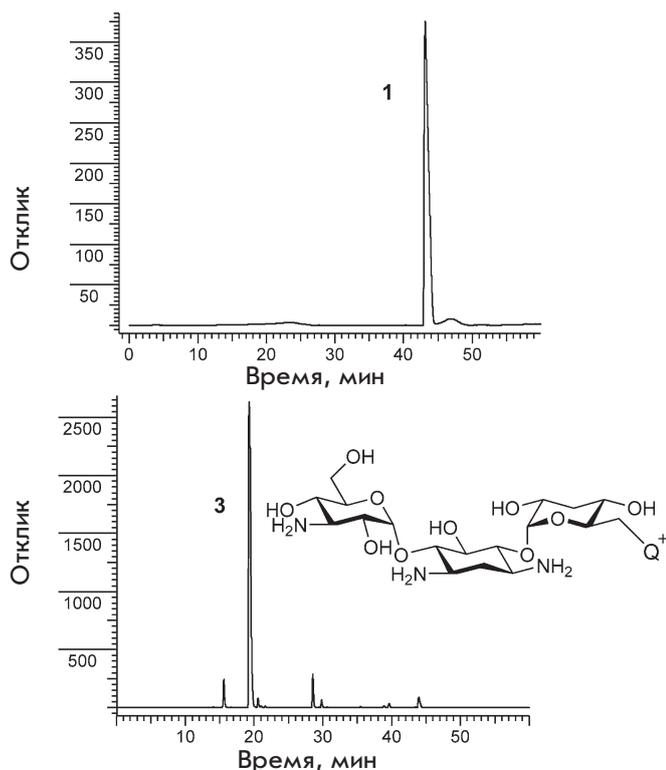


Рис. 8. Профиль ВЭЖХ соединения **1** (верхний) и конъюгата **3** (**1** с канамицином) (нижний). Условия см. в «Экспериментальной части»

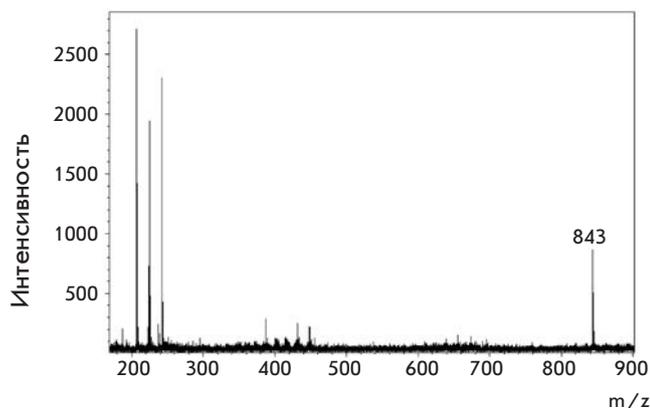


Рис. 9. Пик в масс-спектре конъюгата **3** при нанесении 2×10^{-12} моль вещества в ячейку мишени для масс-спектрометра (матрица – синапиновая кислота) (s/n 47.2)

тить, что увеличение массы исследуемого вещества на 359 Да позволяет сместить сигнал в спектре в сторону бóльших значений, что исключает перекрывание с сигналами матрицы.

Чтобы ответить на вопрос, как дериватизация влияет на чувствительность обнаружения канамицина в МАЛДИ-МС, был проведен эксперимент по со-

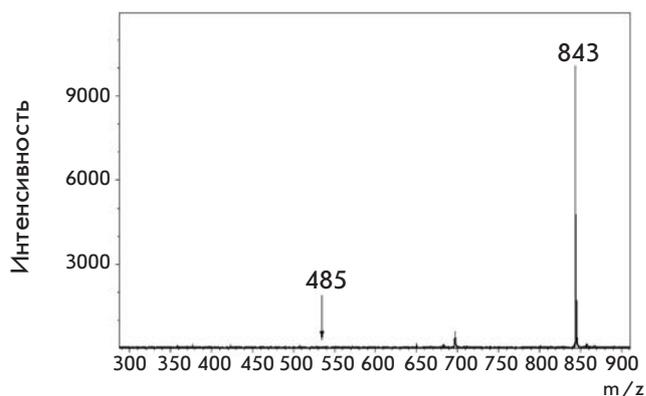


Рис. 10. Спектр МАЛДИ-МС эквимольной смеси соединения **3** (m/z 843 (s/n 301.3)) и немодифицированного канамицина (m/z 485 (s/n 1.8) [$M+H^+$]) (матрица – синапиновая кислота)

вместной детекции канамицина и продукта его дериватизации. На рис. 10 представлен спектр МАЛДИ-МС эквимольной смеси немодифицированного канамицина и соединения **3**.

Интенсивность пика тритил/акридиниевого производного настолько высокая, что превосходит интенсивность пика немодифицированного антибиотика не менее чем на два порядка, и визуально полностью нивелирует его. При увеличении соотношения канамицин/канамицин- Q^+ до 200 : 1 видно, что интенсивности сигналов становятся одного порядка, но интенсивность пика производного **3** все равно превосходит таковую для немодифицированного соединения (рис. 11). Таким образом, Q^+ -дериватизация снижает предел обнаружения канамицина в МАЛДИ-МС на несколько порядков.

При обработке канамицина избытком соли **1** продуктом все равно остается соединение **3**: реакционная способность остальных аминогрупп значительно уступает активности группы $-CH_2NH_2$. Это свойство было использовано для одновременной детекции нескольких аминогликозидных антибиотиков с помощью масс-спектрометрии. На смесь четырех антибиотиков действовали избытком соли **1** и регистрировали МАЛДИ-масс-спектр образующихся аддуктов (рис. 12). В полученном масс-спектре видны сигналы аддуктов канамицин- Q^+ (**3**) (m/z 843, s/n 142.8), сисомицин- Q^+ (m/z 806, s/n 166.4), тобрамицин- Q^+ (m/z 826, s/n 233.2) и паромомицин- Q^+ (m/z 974, s/n 56.7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный метод дериватизации аминоксодержащих углеводов позволяет определять их с помощью масс-спектрометрии МАЛДИ и ОФ-ВЭЖХ

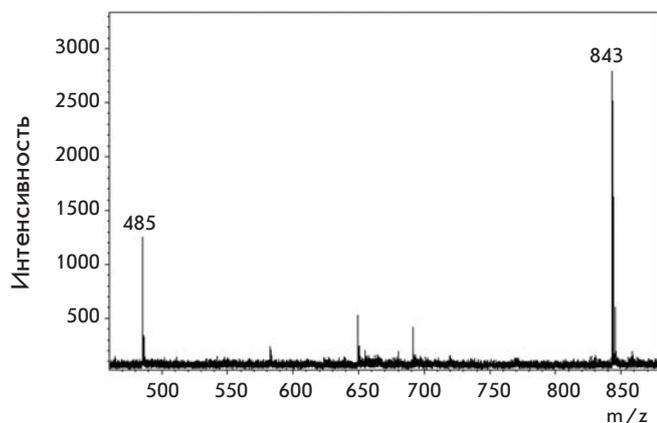


Рис. 11. Спектр МАЛДИ-МС смеси канамицина (m/z 485 (s/n 49.1) $[M+H^+]$) и конъюгата **3** (m/z 843 (s/n 89.5)) в соотношении концентраций 200 : 1 (0.01 М : 0.00005 М) (наносили по 0.9 мкл каждого) (матрица – 1-циано-4-гидроксикоричная кислота)

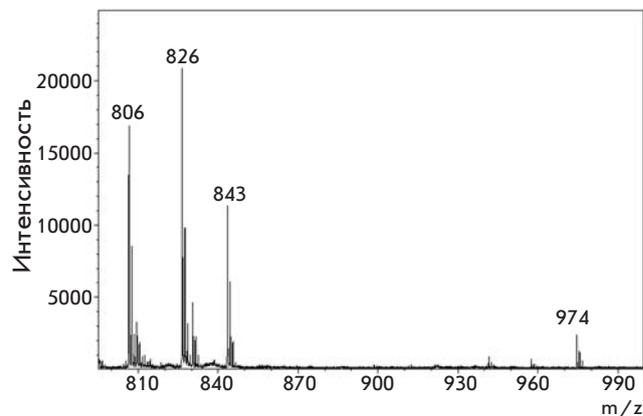


Рис. 12. Спектр МАЛДИ-МС смеси модифицированных антибиотиков (матрица – синапиновая кислота). Условия в «Экспериментальной части»

с УФ-детектором. Показано, что модификация идет по аминогруппе, связанной с первичным атомом углерода. Дериватизация позволяет увеличить чувствительность масс-спектрометрической детекции аминогликозидов на несколько порядков. Преимуществами метода являются экспрессность, экспериментальная простота и доступность реагентов. ●

Авторы выражают благодарность Н.В. Бовину за предоставленный аминоклюцитол и Р.С. Борису за полезное обсуждение. Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siegenthaler W.E., Bonetti A., Luthy R. // Am. J. Med. 1986. V. 80. № 6B. P. 2–14.
- Jackson J., Chen C., Buising K. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2013. V. 26. № 6. P. 516–525.
- Becker B., Cooper M.A. // ACS Chem. Biol. 2013. V. 8. № 1. P. 105–115.
- Tian Y., Chen G., Guo L., Guo X., Mei X. // Food Anal. Meth. 2015. V. 8. № 7. P. 1842–1857.
- Farouk F., Azzazy H.M.E., Niessen W.M.A. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 890. P. 21–43.
- Diez C., Guillarme D., Spörri A.S., Cognard E., Ortelli D., Edder P., Rudaz S. // Anal. Chim. Acta. 2015. V. 882. P. 127–139.
- Li R., Liu Y., Cheng L., Yang C., Zhang J. // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 19. P. 9372–9375.
- Zengin A., Tamer U., Caykara T. // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 817. P. 33–41.
- Котова В.Ю., Рыженкова К.В., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б. // Прикл. биохим. микробиол. 2014. Т. 50. № 1. С. 112–117.
- Dijkstra J.A., Sturkenboom M.G.G., van Hateren K., Koster R.A., Greijdanus B., Alffenaar J.-W.C. // Bioanalysis. 2014. V. 6. № 16. P. 2125–2133.
- Li D., He S., Deng Y., Ding G., Ni H., Cao Y. // Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2014. V. 93. № 1. P. 47–52.
- Sharma T.K., Ramanathan R., Weerathunge P., Mohammad-taheri M., Daima H.K., Shukla R., Bansal V. // Chem. Commun. 2014. V. 50. № 100. P. 15856–15859.
- Bijleveld Y., de Haan T., Toersche J., Jorjani S., van der Lee J., Groenendaal F., Dijk P., van Heijst A., Gavilanes A.W.D., de Jonge R., et al. // J. Chromatogr. B. 2014. V. 951/952. P. 110–118.
- Korany M.A.-T., Haggag R.S., Ragab M.A., Elmallah O.A. // J. Chrom. Sci. 2014. V. 52. № 8. P. 837–847.
- Воронежцева О.В., Ермолаева Т.Н. // Сорбц. хром. проц. 2011. Т. 11. № 1. С. 68–76.
- Левин Г.Я., Соснина Л.Н. // Антибиот. химиотер. 2014. Т. 59. № 3/4. С. 10–11.
- Chen J., Li Z., Ge J., Yang R., Zhang L., Qu L., Wang H., Zhang L. // Talanta. 2015. V. 139. P. 226–232.
- Wang Y., Ji S., Zhang F., Zhang F., Yang B., Liang X. // J. Chromatogr. A. 2015. V. 1403. P. 32–36.
- Топольян А.П., Стрижевская Д.А., Слюндина М.С., Беляева М.А., Иванова О.М., Коршун В.А., Устинов А.В., Михура И.В., Формановский А.А., Борисов Р.С. // Масс-спектрометрия. 2015. Т. 12. № 4. С. 253–258.
- Martin J.C., Smith R.G. // J. Am. Chem. Soc. 1964. V. 86. № 11. P. 2252–2256.
- Laursen B.W., Krebs F.C. // Chem. Eur. J. 2001. V. 7. № 8. P. 1773–1783.
- Laursen B.W., Krebs F.C., Nielsen M.F., Bechgaard K., Christensen J.B., Harrit N. // J. Am. Chem. Soc. 1998. V. 120. № 47. P. 12255–12263.
- Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G.A., et al. // Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- <http://www.chemcraftprog.com/>