

# ŘEŠENÍ STRUKTUR CYKLOSPORINŮ METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Předneseno V. Havlíčkem při udělení Baderovy ceny 1996

VLADIMÍR HAVLÍČEK<sup>a</sup>, ALEXANDR JEGOROV<sup>b</sup>, PETR SEDMERA<sup>a</sup>  
a MIROSLAV RYSKA<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, <sup>b</sup>Galena a.s., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, <sup>c</sup>Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 13.XI.1996

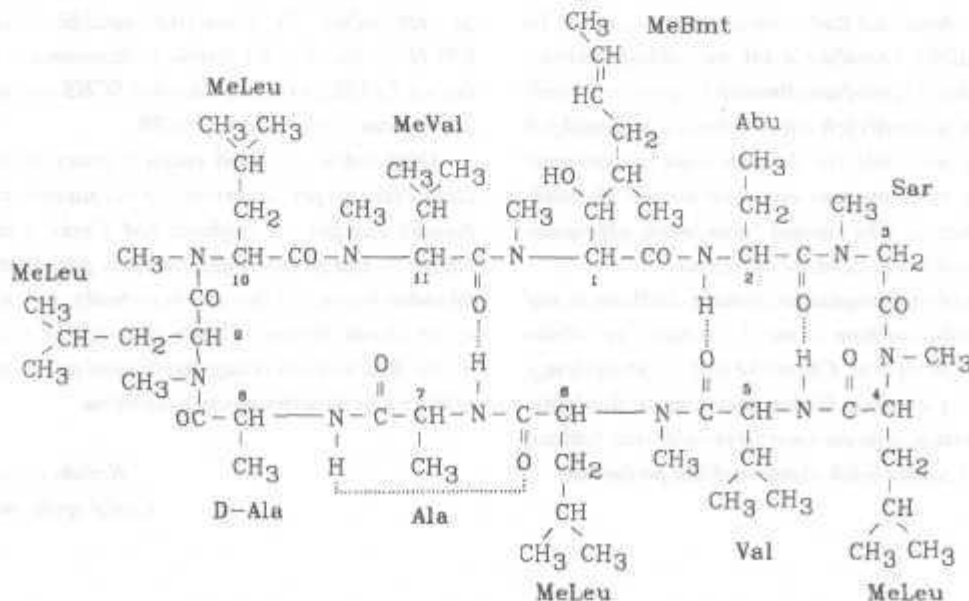
## Obsah

1. Úvod
2. Určení molekulové hmotnosti
3. Charakterizace aminokyselin přítomných v molekule
4. Sekvenční analýza
5. Odlišení izobarických aminokyselin
6. Analýza směsí
7. Kvantitativní hmotnostní spektrometrie

## 1. Úvod

Hmotnostní spektrometrie, zabývající se analýzou iontů organických látek, je neodmyslitelnou součástí instrumentálních metod používaných organickými chemiky k určení produktů chemických reakcí nebo k jejich monitorování. Přednosti metody jsou především vysoká citlivost a rychlost, v neposlední řadě pak možnost účinně řešit struktury jednotlivých složek komplikovaných směsí. Jednou z oblastí organické chemie, kde hmotnostní spektrometrie přispívá zásadním způsobem, je určování struktur přírodních i syntetických peptidů. K důležitým reprezentantům této skupiny látek patří cyklické hydrofobní undekapeptidy – cyklosporiny, produkované některými druhy vláknitých hub. Cyklosporin A (CsA, obr. 1) vykazuje význačné antifungální, antiparazitické a imunosupresivní účinky a v praxi je používán k léčbě posttransplantačních stavů a autoimunitních chorob<sup>1</sup>. Některé další analogy, odvozené záměnou jedné nebo dvou aminokyselin, mají uplatnění při léčbě MDR<sup>2</sup> nebo AIDS<sup>3</sup>.

Ještě nedávno byla hmotnostní spektrometrie (MS) při studiu struktur nových cyklosporinů zastíněna jinými ana-



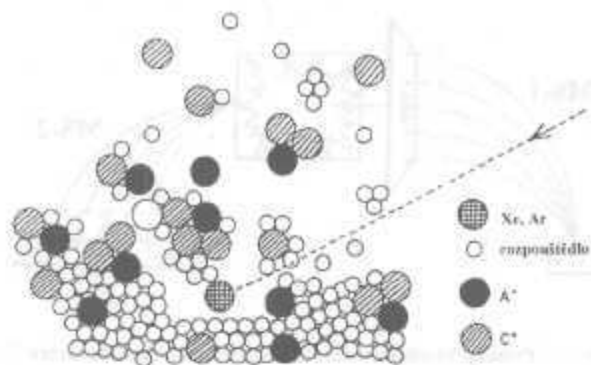
Obr. 1. Struktura cyklosporinu A

lytickým technikami, především metodou NMR a RTG difrakcí. Její příspěvek spočíval jen ve změření molekulové hmotnosti. Zavedení nových metodických postupů, které umožňují detailně charakterizovat primární struktury těchto látek, resp. jejich směsí, je věnována tato práce.

## 2. Určení molekulové hmotnosti

Informaci o molekulové hmotnosti poskytují hmotnostní spektra získaná prakticky všemi ionizačními technikami. Údaje o molekulových hmotnostech cyklosporinů poskytují spektra získaná tzv. měkkými ionizačními technikami, jako je desorpce plazmatem<sup>4</sup> kalifornia 252, chemická ionizace<sup>5</sup>, desorpce laserem<sup>6</sup>, desorpce polem<sup>7</sup> a především ionizace rychlými atomy (FAB) nebo ionty (FIB)<sup>8</sup>.

Pozornost bude věnována především metodě FAB, s jejíž pomocí lze ve strukturní analýze cyklosporinů uplatnit

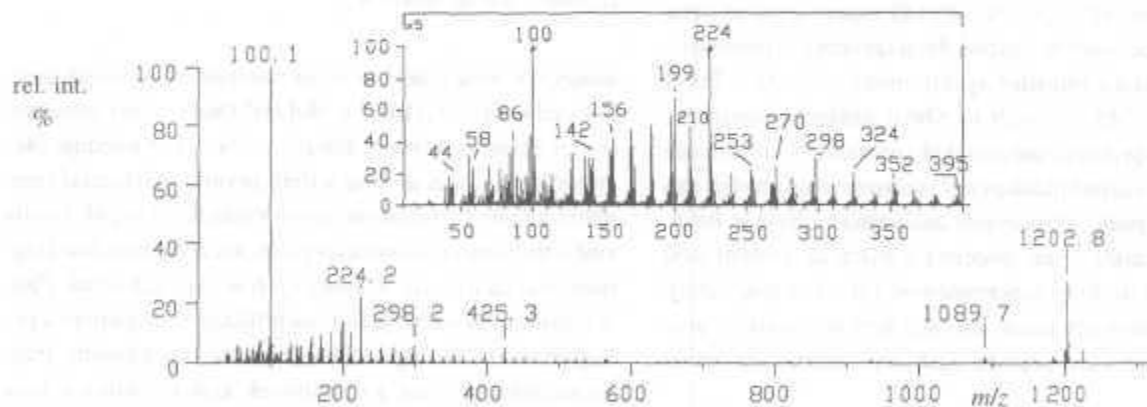


Obr. 2. Uvolňování sekundárních částic dopadem primárních atomů<sup>9</sup>

řadu dalších technik. Metoda je založena na bombardování vzorku rozpuštěného v kapalné matrici svazkem urychlených částic<sup>9</sup>, například atomů xenonu (obr. 2). Konvenční FAB spektrum pozitivních iontů cyklosporinu A (obr. 3) poskytuje v molekulární oblasti kationty patřící protonované molekule  $[M+H]^+$  ( $m/z$  1202,8) a aduktu s kationtem sodíku  $[M+Na]^+$  ( $m/z$  1224,8), zatímco při snímání negativních iontů je možno pozorovat ion deprotonované molekuly  $[M-H]^-$ . Měření elementárního složení těchto iontů se na sektorových strojích s vysokou rozlišovací schopností provádí nejčastěji srovnávací metodou „peak-matching“ za použití rotačního terče a kalibračního standardu (např. Ultramark 1600F). Požadované minimální rozlišení přístroje pro úspěšné měření elementárního složení v oblasti molekulárních hmotností cyklosporinů je kolem 15 000.

## 3. Charakterizace aminokyselin přítomných v molekule

Použití 3-nitrobenzylalkoholu jako matrice, jejíž protonová afinita je v porovnání s cyklosporiny nízká, vede k velmi čistým FAB spektrům pozitivních iontů (obr. 3). V oblasti nižších hmotností obsahují tato spektra četné imoniové ionty jednotlivých aminokyselin<sup>10</sup>, mezi nimiž dominuje ion  $m/z$  100,1 patřící N-methyl-leucinu, tj. v molekule nejčastěji zastoupené aminokyselině. Střední oblast pak poskytuje fragmentové ionty obsahující různý počet aminokyselin. Výčet hlavních iontů CsA, včetně jejich elementárního složení, uvádí tabulka I. Důležitá je dále oblast vyšších hmotností spektra obsahující kromě  $[M+H]^+$  a  $[M+Na]^+$  iontů též ion  $[M+H-113]^+$ ,  $m/z$  1089,7. Ten určuje velikost postranního řetězce MeBmt, a tudíž se ho



Obr. 3. FAB spektrum pozitivních iontů cyklosporinu A

Tabulka I  
Hlavní pozitivní ionty konvenčního FAB spektra cyklosporinu A

Typ iontu	Přiřazení	Hmotnost změřená	Hmotnost vypočtená	Elementární složení	c <sup>a</sup>
imoniový	Sar nebo Ala	44,0502	44,0500	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> N	~100
imoniový	Abu	58,0659	58,0657	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N	~80
imoniový	Val	72,0820	72,0813	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N	~60
imoniový	MeVal	86,0960	86,0970	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N	90
imoniový	MeLeu	100,1130	100,1126	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N	90
imoniový	MeBmt	156,1340	156,1388	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> NO	~50
[MH-C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> O] <sup>+</sup>	Ztráta bočního řetězce v MeBmt	1089,755	1089,752	C <sub>55</sub> H <sub>99</sub> N <sub>11</sub> O <sub>11</sub>	~100
[M+H] <sup>+</sup>	Protonovaná molekula	1202,847	1202,849	C <sub>62</sub> H <sub>112</sub> N <sub>11</sub> O <sub>12</sub>	~100

<sup>a</sup>Příspěvek daného iontového druhu iontovému proudu příslušné nominální hmotnosti (%)

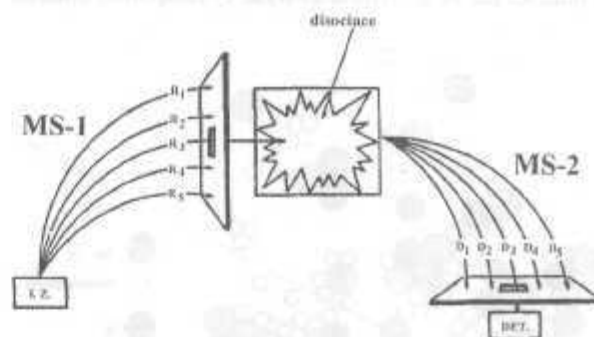
s výhodou používá pro rychlou kontrolu úspěšnosti přípravy semisyntetických derivátů nebo identifikaci metabolitů modifikovaných právě na této aminokyselině.

#### 4. Sekvenční analýza

První práce<sup>11</sup> zabývající se určením sekvencí aminokyselin v metabolitech cyklosporinu A pomocí MS zahrnovaly úplnou nebo částečnou hydrolýzu látky, derivatizaci vzniklých volných aminokyselin a následnou GC/MS analýzu směsi derivátů (EI ionizace). Nevýhodou této metody byla její pracnost a především značná časová náročnost celé analýzy.

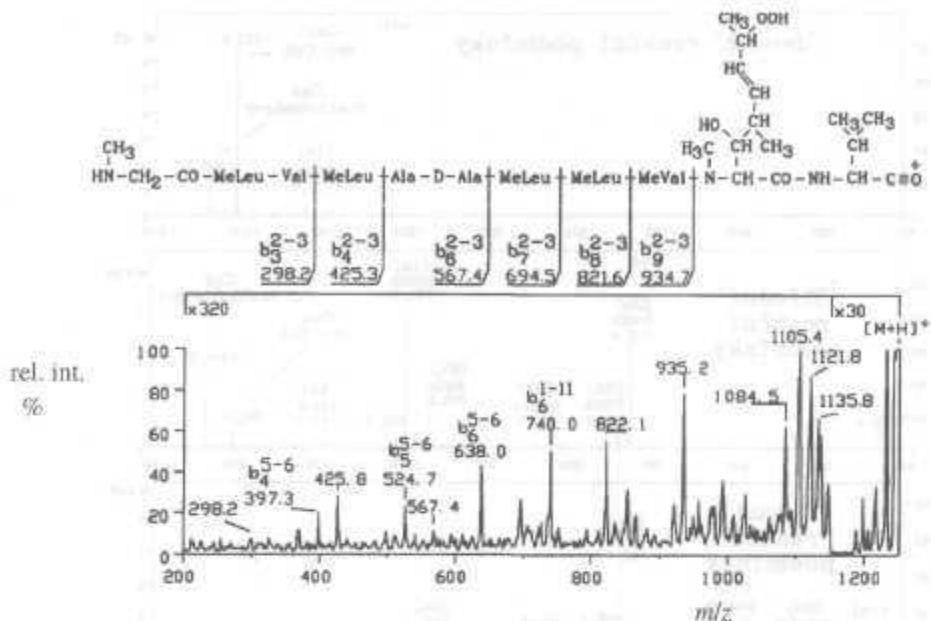
Účinnějším řešením je použití tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Při MS/MS experimentu je třeba mít k dispozici systém alespoň dvou spřažených hmotnostních analyzátorů případně spektrometrů (obr. 4)<sup>12</sup>. První spektrometr (MS-1) slouží k výběru žádaného iontového druhu (např. protonované molekuly peptidu). V kolizní cele nastává jeho rozpad indukovaný srážkou s atomy terčového plynu, v případě sektorových analyzátorů obvykle helia. Produkty vzniklé touto disociací a jejich zastoupení jsou analyzovány druhým spektrometrem (MS-2) a představují spektrum dceřiných iontů. Získané dceřiné spektrum protonované molekuly peptidu poskytuje žádané sekvenční informace.

Bylo zjištěno, že u cyklosporinů dochází k dominantní primární protonaci při ionizaci FAB převážně na třech

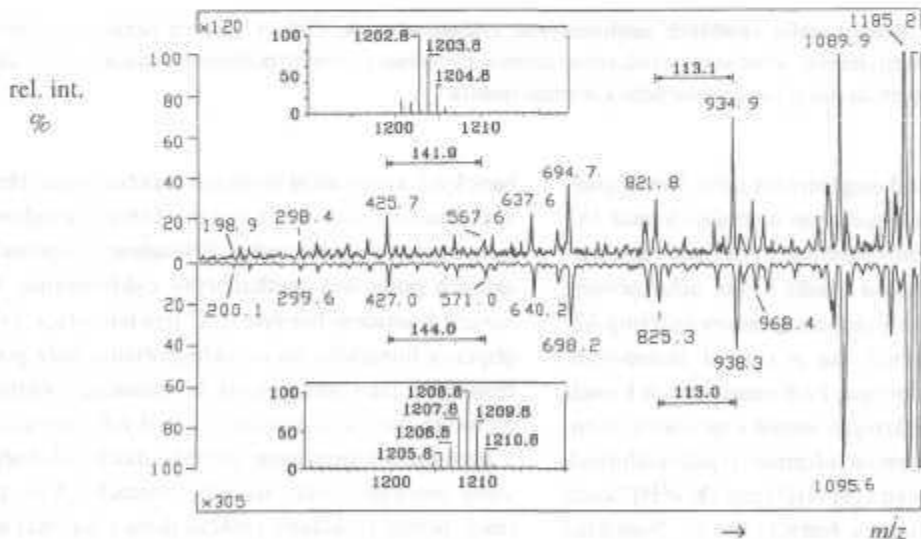


Obr. 4. Princip tandemového hmotnostního spektrometru<sup>12</sup>. I.Z. = iontový zdroj, DET. = detektor. R<sub>n</sub> = píky v konvenčním spektru (rodičovské ionty). První analyzátor nastaven tak, aby do kolizní cely procházel pouze ion R<sub>3</sub>, který disociuje na fragmenty D<sub>n</sub> tvořící dceřiné spektrum

místech v molekule<sup>13</sup>, a to na dusíkových atomech aminokyselin Sar<sup>3</sup>, MeBmt<sup>1</sup> a MeLeu<sup>6</sup> (horní index označuje pozici aminokyseliny v řetězci - obr. 1). Následuje otevření kruhu mezi druhou a třetí, první a jedenáctou resp. pátou a šestou aminokyselinou. Výsledkem je pak tvorba směsi tří lineárních undekapeptidů, které mohou dále fragmentovat na tři série N-koncových acyliových iontů. Způsob jejich přiřazení je ukázán na příkladu hydroperoxo-cyklosporinu D (obr. 5)<sup>14</sup>. Obecná platnost popsaného fragmentačního chování za podmínek kolizní aktivace byla prokázána na sérii dvaceti přírodních cyklosporinů nebo jejich semisyntetických derivátů<sup>15</sup>.



Obr. 5. Kolizní dceřiné spektrum protonované molekuly hydroperoxy-cyklosporinu D. Pozorované N-koncové fragmentové ionty jsou acylového typu, které se podle užívané nomenklatury<sup>10</sup> označují písmenem b. Horní index u příslušného iontového druhu definuje místo primárního otevírání kruhu cyklosporinu (např. mezi 2. a 3. aminokyselinou), spodní index pak počet aminokyselin přítomných v daném oligopeptidovém iontu (viz schéma v horní části obrázku)

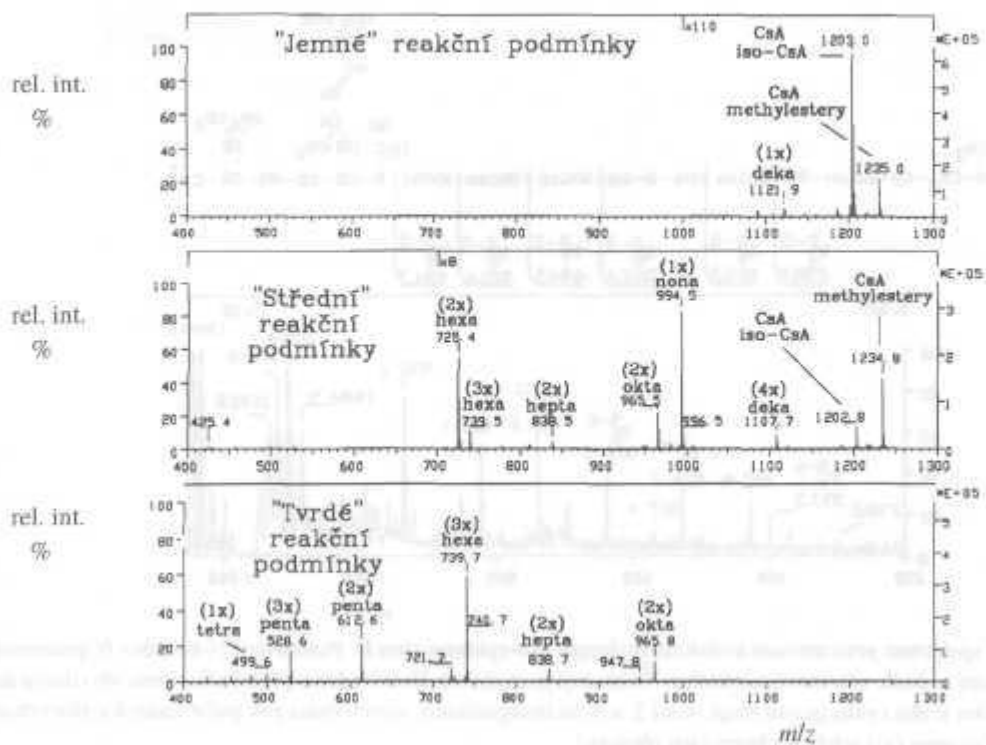


Obr. 6. Kolizní spektra protonované (nahore) a deuterované molekuly cyklosporinu A (dole). Ve výřezech jsou izotopové profily „molekulární“ oblasti protonované resp. deuterované molekuly CsA

## 5. Odlišení izobarických aminokyselin

Problém rozlišení izobarických aminokyselin (aminokyselin majících stejnou molekulovou hmotnost) v cyklosporinech zahrnuje mj. odlišení alaninu od sarkosinu, valinu od norvalinu a především leucinu od isoleucinu a N-methyl-valinu. Kvalitativní důkaz přítomnosti dané aminoky-

seliny je založen na charakteristické fragmentaci jejího imoniového iontu vybraného ze spektra příslušného cyklosporinu a následném porovnání s fragmentací imoniového iontu volné aminokyseliny<sup>16</sup>. Důkaz tohoto typu platí pro aminokyseliny MeVal, Leu, Ile, Val a Nva, nelze ho ovšem použít k odlišení Ala od Sar. Jedním z důvodů je skutečnost, že dvojice Ala-D-Ala se během fragmentace



Obr. 7. Konvenční FAB spektra směsí vzniklých methanolýzou cyklosporinu A. Číslo v závorce označuje teoretický počet oligo-peptidů (resp. jejich methylesterů), které mají požadovanou hmotnost a mohou za daných podmínek vznikat. Jednoznačné určení sekvence vybraného oligo-peptidu pak plyne z příslušného kolizního spektra

eliminuje jako neutrální diketopiperazin nebo 3-methylaziridin<sup>17</sup>, což lze dokázat spektrem neutrálních ztrát 142 hmotnostních jednotek. Imoniové ionty Ala mají v konvenčním spektru slabou intenzitu a tudíž s nimi nelze provést MS/MS experiment. Protože izobarické aminokyseliny Ala a Sar se liší v N-substituci, lze je rozlišit izotopovým značením. Při použití deuterované FAB matrice dojde k snadné výměně kyselých vodíkových atomů v molekule. Konvenční FAB spektra poskytnou informaci o počtu labilních atomů vodíku, kolizní spektra  $[M+H]^+$  resp.  $[M+2H]^+$  iontů informace o jejich lokalizaci v řetězci (obr. 6). Například z hmotnostních rozdílů mezi ionty  $b_6^{2-3}$  a  $b_4^{2-3}$  (141,9 pro nederivatizovaný a 144,0 pro značený cyklosporin) lze určit fragment Ala-D-Ala obsahující dva kyselé vodíkové atomy.

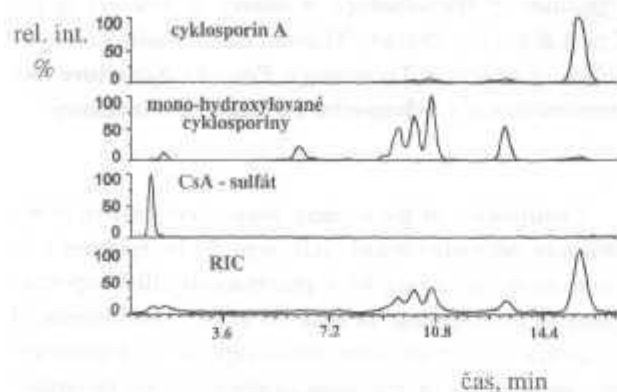
## 6. Analýza směsí

Jednou z nezanedbatelných výhod tandemové hmotnostní spektrometrie je její schopnost řešit struktury neizo-

barických komponent tvořících reakční směsi. Hmotnostní spektrometrie pak může organickému chemikovi sloužit k monitorování jeho reakcí. Příkladem je optimalizace reakčních podmínek methanolýzy cyklosporinu A katalyzované fluoridem boritým<sup>18</sup>. Cílem této práce byla jednak příprava lineárního *seco*-cyklosporinu a dále použití methanolýzy jako alternativní hmotnostně-spektrometrické metodiky pro sekvenování cyklických peptidů, které je v porovnání s lineárními peptidy daleko složitější (z důvodu otevírání kruhu na více místech). Vliv podmínek (mol. poměr reaktantů, reakční doba a teplota) na složení reakční směsi je znázorněn na obr. 7.

K analýze směsí obsahujících izobarické peptidy je možno využít spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Například k určení struktur produktů bazické hydrolyzy cyklosporinu A byla použita<sup>19</sup> metoda bombardování rychlými atomy s plynulým přísunem vzorku (CF-FAB). Její určitou nevýhodou jsou ovšem omezená průtoková rychlost mobilní fáze a komplikace způsobené přidáváním FAB matrice do chromatografického systému.

Vývoj nových ionizačních technik jako je elektrosprej



Obr. 8. HPLC/APCI-MS chromatogramy směsi metabolitů CsA izolovaných ze psích jater. Spodní záznam patří časové závislosti celkového iontového proudu, horní záznamy pak iontovým chromatogramům jednotlivých metabolitů

(ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) umožnil rutinně realizovat přímé spojení HPLC/MS v širokém rozsahu průtokových rychlostí mobilní fáze ( $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  až  $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Výhodou těchto systémů je také jejich citlivost: mez detekce pro cyklosporin je hluboko pod jedním femtomolem látky na mikrolitr mobilní fáze. Aktivace iontů přímo v iontovém zdroji, pracujícím za atmosférického tlaku, umožňuje změřit „kolizní“ spektra všech peptidů postupně eluovaných z chromatografické kolony a tak získat kompletní sekvenční informace o všech složkách dělené směsi. HPLC/ESI-MS nebo HPLC/APCI-MS se tak výborně hodí k analýze minoritních cyklosporinů ve fermentačních tekutinách nebo ke stanovení struktur metabolitů CsA (obr. 8).

## 7. Kvantitativní hmotnostní spektrometrie

Rovněž při kvantitativním stanovení cyklosporinů nehraje hmotnostní spektrometrie podřadnou roli. Její vysoká citlivost, reprodukovatelnost a rychlost byly prokázány detekcí cyklosporinu A a jeho metabolitů v krvi<sup>20</sup>. Při použití analyzátoru z doby letu (TOF) byly určeny detekční meze v řádu jednotek  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  celé krve jak při ionizaci laserem (MALDI), tak při ionizaci rychlými ionty (FIB). Selektivita a rychlost těchto technik je výrazně vyšší než u dosud užívaných imunologických metod nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

## Seznam akronymů převzatých z anglosaské literatury

Abu	Aminobutyric acid
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrom
Ala	Alanine
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CA	Collisional Activation
CF-FAB	Continuous-Flow FAB
EI	Electron Impact
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
FIB	Fast Ion Bombardment
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
HPLC/MS	High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MDR	Multi Drug Resistance
MeBmt	(4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-dimethyl-L-threonine
MeLeu	N-methyl-leucine
MeVal	N-methyl-valine
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
Sar	Sarcosine
TOF	Time-of-Flight

*Tato práce byla podporována Grantovou agenturou České republiky (grant č.203/97/0623) a Ministerstvem školství ČR (grant VF96085).*

## LITERATURA

1. Wenger R. M.: Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 50, 123 (1986).
2. Twentymans P. R.: Br. J. Cancer. 57, 254 (1988).
3. Rosenwirth B., Billich A., Datema R., Donatsch P., Hammerschmid F., Harison R., Hiestand P., Jaksche H., Mayer P., Peichl P., Quesniaux V., Schatz F., Schuurman H.-J., Traber R., Wenger R., Wolff B., Zenke G., Zurini M.: Antimicrob. Agents Chemother. 38, 1763 (1994).
4. Henricsson S., Lindholm A., Johansson A.: Transplant. Proc. 21, 837 (1989).
5. Kalinoski H. T., Wright B. W., Smith R. D.: Biomed. Environ. Mass Spectrom. 75, 239 (1988).
6. Cotter R. J., Tabet J.-C: Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 53, 151 (1983).

7. Traber R., Hofmann H., Loosli H. R., Dache W., von Wartburg A.: *Helv. Chim. Acta* **70**, 13 (1987).
8. Orlando R., Fenselau C. C, Cotter R. J.: *Org. Mass Spectrom.* **24**, 1033 (1989).
9. de Pauw E.: *Mass Spectrom. Rev.* **5**, 191 (1986).
10. Roepstorff P., Fohlman J.: *Biomed. Mass Spectrom.* **11**, 601 (1984).
11. Hartman N. R., Trimble L. A., Vederas J. C, Jardine I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 964 (1985).
12. Biemann K., Scobble H. A.: *Science* **237**, 992 (1987).
13. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Ryska M.: *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1440 (1993).
14. Sedmera P., Havlíček V., Jegorov A., Segre A.-L.: *Tetrahedron Lett.* **36**, 6953 (1995).
15. Havlíček V.: *Disertační práce*. VŠCHT. Praha 1995.
16. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Wagner-Redeker W., Ryska M.: *J. Mass Spectrom.* **30**, 940 (1995).
17. Cordero M. M., Houser J. J., Wesdemiotis Ch.: *Anal. Chem.* **65**, 1594 (1993).
18. Havlíček V., Jegorov A., Sedmera P., Ryska M.: *J. Mass Spectrom., Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, S158.
19. Jegorov A., Havlíček V., Sedmera P.: *Amino Acids* **10**, 145 (1996).
20. Muddiman D. C, Gusev A. I., Proctor A., Hercules D., Venkataraman R., Diven W.: *Anal. Chem.* **66**, 2362 (1994).

**V. Havlíček<sup>a</sup>, A. Jegorov<sup>b</sup>, P. Sedmera<sup>a</sup> and M. Ryska<sup>c</sup>**  
 (<sup>a</sup>*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, <sup>b</sup>*Galena, České Budějovice*, <sup>c</sup>*Institute of Chemical Technology, Prague*): **Structure Determination of Cyclosporins by Mass Spectrometry**

Contribution of the modern mass spectrometry to the structure determination of cyclic peptides is explained with compounds belonging to a pharmaceutically important group of cyclosporins. In addition to the determination of molecular weight and elemental composition of molecule, also the presence of individual amino acids may be estimated. Their sequence can be derived from the daughter ion mass spectra of the protonated molecule obtained in a tandem experiment. Comparison of the characteristic fragmentation of immonium ions in the spectra of peptides and free amino acids makes possible to distinguish even isobaric amino acids one from another. Examples of use of the tandem mass spectrometry in the analysis of mixtures are presented. Coupling of high-performance liquid chromatography and mass spectrometry utilizing fast-atom bombardment, electrospray, and atmospheric pressure chemical ionization, is discussed. The quantitative analysis of cyclosporins in biological samples using laser desorption or fast-ion bombardment with time-of-flight ion analysis surpasses immunologic assays in selectivity and fast performance.