

Untersuchungen an Stoffwechselprodukten von Mikroorganismen, VII¹⁾

Massenspektrometrische Untersuchungsmethoden zur Struktur- aufklärung von Makrolid-Antibiotika

Hans Achenbach* und Wolfgang Karl

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.,
D-7800 Freiburg i. Br., Albertstr. 21

Eingegangen am 6. August 1974

Ausgehend von den Studien *Rinehart's*²⁾ wurde im Zusammenhang mit der Strukturermittlung der Aldgamycine eine Reihe von Makrolid-Antibiotika massenspektrometrisch untersucht. In Verbindung mit hochaufgelösten Messungen läßt sich aus den entsprechenden Schlüsselfragmenten die Anzahl, die Art der Anordnung und die Elementarzusammensetzung der Zucker ermitteln. Ebenso kann die Elementarzusammensetzung des im allgemeinen präparativ nicht zugänglichen Aglycons bestimmt werden. In Verbindung mit mikropräparativen Umwandlungen und H/D-Austauschexperimenten lassen sich Angaben über Art und Anzahl der funktionellen Gruppen in den Zuckern und im Aglycon machen. Weitergehende Aussagen über die Struktur des Aglycons aufgrund der MS-Fragmentierung sind offensichtlich nur in Einzelfällen möglich.

Investigations on Metabolites of Microorganisms, VII¹⁾

Mass Spectrometric Methods in the Structure Elucidation of Macrolides

Initiated by *Rinehart's* studies²⁾ and in connection with the structure elucidation of the aldgamycins the mass spectra of some macrolides have been measured. Together with high resolution measurements the number, kind of connection, and elemental composition of the sugars can be deduced from key fragments. Furthermore the elemental composition of the aglycon usually not accessible by preparative methods can be deduced. Mass spectra from micro-preparative reaction products and H/D-exchange experiments give informations on the number and kind of functional groups present in the sugars and in the aglycon. Further evidence on the structure of the aglycon from the m. s. fragmentation pattern seems to be limited to single cases.

Da uns für die Strukturermittlung von Aldgamycin E^{1,3)} und Aldgamycin F⁴⁾ nur eine sehr geringe Substanzmenge zur Verfügung stand, haben wir uns speziell für die Frage interessiert, welche Strukturinformationen durch massenspektrometrische Untersuchungsmethoden in dieser Substanzklasse der Makrolid-Antibiotika erhalten werden können. Bei den Makroliden wird schon länger die Massenspektrometrie

¹⁾ VI. Mittel.: H. Achenbach und W. Karl, Chem. Ber. 108, 759 (1975), vorstehend.

²⁾ K. L. Rinehart jr., R. F. Schimbor und T. H. Kinstle, Antimicrob. Ag. Chemother. 1965, 119; K. L. Rinehart jr. und G. E. Van Lear, Abstr. papers, 15th Ann. Conf. Mass Spectrom. Allied Topics, ASTM E-14, S. 396, Denver 1967.

³⁾ M. P. Kunstmann, L. A. Mitscher und E. L. Patterson, Antimicrob. Ag. Chemother. 1964, 87.

⁴⁾ H. Achenbach und W. Karl, Chem. Ber. 108, 780 (1975), nachstehend.

zur Bestimmung der Mol.-Masse und Elementarzusammensetzung herangezogen^{5,6)}. Diese Bestimmungen haben hier besondere Bedeutung, weil die entsprechenden konventionellen Analysemethoden wegen des Einschlusses von Lösungsmittel und wegen der Mehrdeutigkeit von Analyseergebnissen⁷⁻⁹⁾ nicht selten unzuverlässige bzw. falsche Werte liefern.

Die Beobachtung der Molekül-Ionen in den Massenspektren gestattet auch Angaben über die Reinheit der Substanz und gegebenenfalls die Erkennung eines Gemisches aus strukturell sehr ähnlich gebauten Verbindungen (= Makrolid-Komplex)¹⁰⁻¹²⁾. Die Bildung solcher Komplexe, die sich mit den bekannten Trennmethode nur schwer in Einzelkomponenten zerlegen lassen, ist aus biogenetischer Sicht verständlich¹³⁾.

Im Gegensatz zur massenspektrometrischen Ermittlung von Mol.-Masse und Elementarzusammensetzung wurde die Fragmentierung von Makroliden im Massenspektrometer bisher jedoch nur vereinzelt an Verbindungen bekannter Struktur studiert^{2,6,6a)}. In jüngster Zeit berichteten japanische Autoren über die Massenspektren von Makroliden im Zusammenhang mit der Trennung und Strukturkorrelation der Komponenten des Makrolid-Komplexes Y-704¹²⁾ und des Maridomycin-Komplexes¹⁴⁾.

Wesentlich bei massenspektrometrischen Untersuchungen ist die Flüchtigkeit und thermische Stabilität der Probe, die gegebenenfalls eine Derivatisierung vor der Messung erforderlich macht.

Unter diesem Aspekt sind neue Ionisierungstechniken von Interesse¹⁵⁾, die auch bereits unter methodischen Gesichtspunkten an Makroliden bekannter Struktur in Einzelfällen erprobt wurden¹⁶⁾. Leider wird gleichzeitig die Fragmentierungstendenz des Molekül-Ions drastisch herabgesetzt, so daß wesentliche MS-Informationen verlorengehen.

Um uns neben den Literaturangaben auf ein möglichst breites eigenes Beobachtungsmaterial stützen zu können, haben wir außer den Massenspektren der Aldgamycine die Massenspektren von mehreren Makroliden*) bekannter Struktur bzw. von deren

*) Die untersuchten Verbindungen gehören ausschließlich zu den sog. „klassischen“ Makroliden; unberücksichtigt bleiben die Polyen-Makrolide (*W. Keller-Schierlein* in *L. Zechmeister*, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. 30, S. 314, Springer, Wien-New York 1973).

⁵⁾ *G. E. Van Lear* und *F. W. McLafferty*, *Annu. Rev. Biochem.* **38**, 312 (1969).

⁶⁾ *K. L. Rinehart jr.* und *G. E. Van Lear* in *G. E. Waller*, *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, S. 457, Wiley-Interscience, New York 1972.

^{6a)} *M. Suzuki*, *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi* **30**, 784 (1972) [*C. A.* **78**, 15094t (1973)].

⁷⁾ *W. Keller-Schierlein* und *G. Roncari*, *Helv. Chim. Acta* **47**, 78 (1964).

⁸⁾ *H. Muxfeldt*, *S. Shrader*, *P. Hansen* und *H. Brockmann*, *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 4748 (1968); *R. W. Rickards*, *R. M. Smith* und *J. Majer*, *J. C. S. Chem. Commun.* **1968**, 1049.

⁹⁾ *B. T. Golding*, *R. W. Rickards*, *W. E. Meyer*, *J. B. Patrick* und *M. Barber*, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 3551.

¹⁰⁾ *Y. Sano*, *J. Antibiot. Ser. A* **7**, 93 (1954), und **9**, 202 (1956).

¹¹⁾ *M. E. Berg* und *T. E. Eble*, *Biochemistry* **7**, 653 (1968).

¹²⁾ *M. Suzuki*, *I. Takamori*, *A. Kinumaki*, *Y. Sugawara* und *T. Okuda*, *J. Antibiot.* **24**, 904 (1971).

¹³⁾ *H. Grisebach*, *Biogenetic Patterns in Microorganisms and Higher Plants*, Wiley, New York 1967.

¹⁴⁾ *M. Muroi*, *M. Izawa* und *T. Kishi*, *Experientia* **28**, 129 (1972).

¹⁵⁾ *H. D. Beckey* in *G. E. Waller*, *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, S. 795, Wiley-Interscience, New York 1972.

¹⁶⁾ *K. L. Rinehart jr.*, *J. C. Cook jr.*, *K. H. Maurer* und *U. Rapp*, *J. Antibiot.* **27**, 1 (1974).

Tab. Massen (*m/e*) und Intensitäten () der Schlüsselfragmente in den Massenspektren der untersuchten Makrolide (Intensitätsangaben bezogen auf den Basispeak = 100)

	M ⁺	A1	A2	B	Z1	Z2	Z3	Z1 + Z2
<i>Makrolide mit mehreren Zuckern</i>								
Aldgamyacin E ³⁾	742 (1)	525 (1.2)	551 (13)	333 (3)	201 (13)	175 (9)		
Monoacetyl-aldgamyacin E	784 (2)	567 (1.5)	551 (9)	333 (7)	201 (11)	217 (46)		
Diacyl-aldgamyacin E	826 (4.5)	567 (1.5)	593 (18)	333 (5)	243 (98)	217 (51)		
Aldgamyacinol E ¹⁾	744 (1)	527 (1)	553 (7)	335 (9)	201 (11)	175 (4)		
Aldgamyacin C ^{a)} 31)	716 (33)	525 (9)		333 (15.5)		175 (41)		
Aldgamyacin F ⁴⁾	756 (1)	539 (7.5)	565 (15)	347 (11.5)	201 (31)	175 (27)		
Monoacetyl-aldgamyacin F	798 (0.4)	581 (1)	565 (12)	347 (5)	201 (10)	217 (46)		
Chalcomycin ^{17, 18)}	700 (1)	539 (3)	509 (9)	347 (4)	145 (20)	175 (14)		
Diacyl-chalcomycin	784 (1)	581 (3)	551 (11)	347 (1.3)	187 (84)	217 (47)		
Erythromycin A ^{19, 20)}	733 (2.3)	558 (4)	559 (1)	383 (1.4)	159 (37)	158 (100)		
Neutramycin ^{23, 24)}	686 (3)	525 (9)	495 (33)	335 (16)	145 (57)	175 (42)		
Oleandomycin ^{21, 22)}	687 (3)	526 (12.5)	513 (13)	351 (59)	145 (79)	158 (91)		
Tylosin ^{25, 26)}	915 (1.4)	754 + 1 (1.8)	724 + 1 (1.3) ^{e)}	389 (1.3)	145 (5.5)	174 (16)	175 (4)	318 (2)
Desmycosin ^{25, 26)}								
(= Desmycarosyl-tylosin)	771 (10)	581 (12)	580 (3.3) ^{e)}	389 (2)		174 (57)	175 (9)	
<i>Abgebaute Makrolide mit nur einem Zucker</i>								
Mycaminosyl-tylonolid ^{b) 27)}	597 (2)	407 (1)			174 (27)			
Carimbose ^{28, 29)}	613 (15)	423 (4)			174 (66)			
Carimbose B ^{30, 29)}	597 (8.5)	407 (2)			174 (28)			

a) Die beiden Zucker im Aldgamyacin C sind isomer.

b) Mycaminosyl-tylonolid = Desmycosin-tylosin.

c) M - (Z3 - O).

Abbauprodukten und Acetyl-Derivaten aufgenommen (Tab.) und — insbesondere durch hochaufgelöste Messungen — genauer studiert.

Alle Spektren konnten ohne weitere Derivatisierung gewonnen werden. Allerdings setzt bei längeren Meßzeiten im Massenspektrometer eine thermische Veränderung ein.

Die Massenspektren der untersuchten Makrolide weisen folgende gemeinsamen Merkmale auf:

- a) Man findet ein Molekül-Ion (M^+) relativ geringer Intensität.
- b) Die massenspektrometrische Fragmentierung ist gekennzeichnet durch den bevorzugten Bruch der glycosidischen Bindung(en). Durch Lokalisierung der Ladung sowohl auf dem Zucker als auch auf dem Makrolacton-Rest entstehen entsprechende Schlüsselfragmente.

Unter Ladungserhaltung auf dem Aglycon wird der Zucker einschließlich des Sauerstoffatoms der glycosidischen Bindung abgespalten, was zu einem Schlüsselfragment A [bei der Masse $M - (Z-O)$] im oberen Massenbereich führt. Sind zwei Zucker (Z_1 und Z_2) im Molekül vorhanden, so treten mehrere entsprechende Schlüsselfragmente (A_1 , A_2) in den Massenspektren auf (Abb. 1). Die Fragmentierung an den glycosidischen Bindungen erfolgt auch sukzessive. Dabei geht der zweite Zucker als Neutralteil vorzugsweise in einem Eliminierungsprozeß (zusammen mit einem Wasserstoff aus dem Aglycon) verloren und es entsteht das Ion **B**. **B** ist häufig begleitet von weniger intensiven Ionen bei $B + 1$ und $B - 1$ ME.

Im unteren und mittleren Massenbereich findet man intensive Fragmente, die den Oxonium-Ionen der Zucker zuzuordnen sind. Diese Ionen Z_1 (und Z_2) korrespondieren mit den erwähnten Schlüsselfragmenten A_1 (und A_2) bzw. **B**.

Die dargelegten Verhältnisse gestatten auch eine Aussage darüber, ob in einem Makrolid mehrere glycosidisch gebundene Monosaccharide vorliegen oder entsprechende glycosidisch gebundene Oligosaccharide: Im Falle eines Makrolids mit glyco-

- 17) Parke, Davis & Company, (Erf. R. Ph. Frohardt, R. F. Pittillo und J. Ehrlich) Ger. Pat. 1109835 [C. A. **56**, 5223 d (1962)].
- 18) P. W. K. Woo, H. W. Dion und Q. R. Bartz, J. Amer. Chem. Soc. **86**, 2726 (1964).
- 19) J. M. McGuire, R. L. Bunch, A. C. Anderson, H. E. Boaz, E. H. Flynn, H. M. Powell und J. W. Smith, Antibiot. Chemother. **2**, 281 (1952).
- 20) P. F. Wiley, K. Gerzon, E. H. Flynn, M. V. Sigal, O. Weaver, U. C. Quarck, R. R. Chauvette und R. Monahan, J. Amer. Chem. Soc. **79**, 6062 (1957).
- 21) H. Els, W. D. Celmer und K. Murai, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 3777 (1958).
- 22) F. A. Hochstein, H. Els, W. D. Celmer, B. L. Shapiro und R. B. Woodward, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 3225 (1960).
- 23) D. V. Lefemine, F. Barbatschi, M. Dann, S. O. Thomas, M. P. Kunstmann, L. A. Mitscher und N. Bohonos, Antimicrob. Ag. Chemother. **1963**, 41.
- 24) L. A. Mitscher und M. P. Kunstmann, Experientia **25**, 12 (1969).
- 25) R. L. Hamill, M. E. Haney, M. Stamper und P. F. Wiley, Antibiot. Chemother. **11**, 328 (1961).
- 26) R. B. Morin, M. Gorman, R. L. Hamill und P. V. Demarco, Tetrahedron Lett. **1970**, 4737.
- 27) R. B. Morin und M. Gorman, Tetrahedron Lett. **1964**, 2339.
- 28) F. W. Tanner, A. R. English, T. M. Lees und R. B. Routien, Antibiot. Chemother. **2**, 441 (1952).
- 29) M. E. Kuehne und B. W. Benson, J. Amer. Chem. Soc. **87**, 4660 (1965); R. B. Woodward, L. S. Weiler und P. C. Dutta, ebenda **87**, 4662 (1965).
- 30) F. A. Hochstein und K. Murai, J. Amer. Chem. Soc. **76**, 5080 (1954).
- 31) G. A. Ellestad, M. P. Kunstmann, J. E. Lancaster, L. A. Mitscher und G. Morton, Tetrahedron **23**, 3893 (1967).

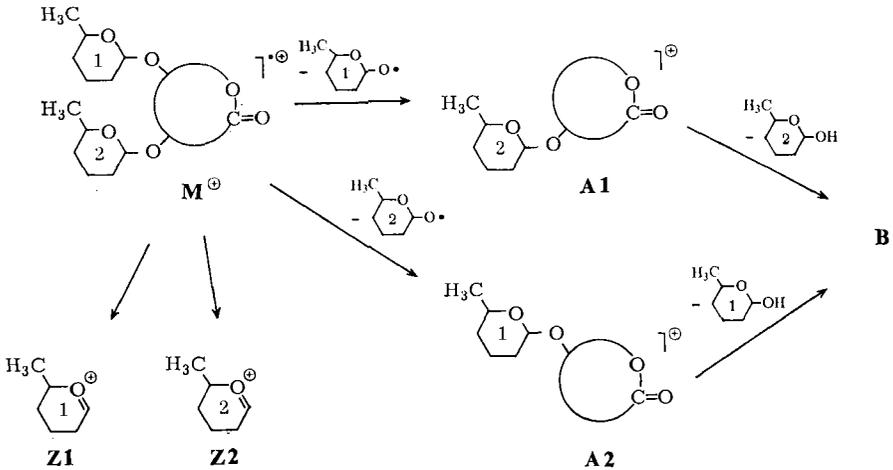


Abb. 1. Massenspektrometrische Fragmentierung von Makroliden mit zwei Zuckern

sidisch gebundenem Disaccharid (z. B. Tylosin) wird ein Fragment bei $M - (Z2 - O)$ (Abb. 2) erwartungsgemäß nicht beobachtet. Im mittleren Massenbereich tritt hier das Oxonium-Ion des Disaccharids (bei der Masse $Z1 + Z2$) auf^{*)}. Aus diesem Zerfallsweg kann die Sequenz des Zucker-Teils abgeleitet werden.

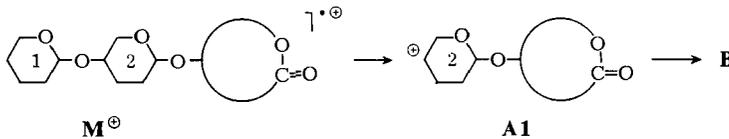


Abb. 2. MS-Zerfall eines Makrolids mit disaccharidischem Zucker

Der Basispeak tritt in den meisten Spektren im unteren Massenbereich auf. Die Ionen in diesem Bereich stammen vorwiegend aus der Fragmentierung der beteiligten Zucker, für die sie Strukturhinweise liefern können (z. B. $m/e = 88$ aus Mycinoose).

Anhand des Massenspektrums und bei Kenntnis der Elementarzusammensetzung der Schlüsselfragmente läßt sich also der Makrolid-Charakter einer Verbindung erkennen oder bestätigen. Aus den erörterten Schlüsselfragmenten kann die Anzahl, die Art der Anordnung und die Elementarzusammensetzung der Zucker entnommen werden.

Außerdem wird die Elementarzusammensetzung des Aglycons sowohl direkt aus dem Schlüsselfragment des Aglycons (**B**) als auch indirekt aus dem Molekül-Ion und den Oxonium-Ionen der Zucker ermittelt.

Wir messen diesem Ergebnis besondere Bedeutung bei, da die Hydrolyse der Makrolide im allgemeinen nur mit sehr schlechten Ausbeuten und unter Zersetzung des Aglycons verläuft^{27, 30, 31)}.

^{*)} Im MS von Tylosin, das neben dem Disaccharid ($Z1 - O - Z2$) noch ein Monosaccharid $Z3$ in glycosidischer Bindung enthält, wird auch das Ion des im Tylosin basischen Zuckers $Z2$ beobachtet: Sekundärer Bruch der zweiten glycosidischen Bindung mit H-Transfer auf den Aminozucker.

Durch die Einbeziehung von leicht zugänglichen Derivaten in die massenspektrometrischen Untersuchungen lassen sich weitere Struktur-Informationen gewinnen: Die Peracetyl-Derivate zeigen — unter entsprechender Massenverschiebung — das gleiche oben skizzierte Fragmentierungsverhalten, wenn man von den „zusätzlichen“ Übergängen im Massenspektrum durch Abspaltung von Essigsäure (als 60 oder 59 ME) und/oder Keten absieht: Anhand der Verschiebung von Molekül-Ion und Schlüsselfragmenten kann die Anzahl acetylierbarer OH- und NH- bzw. NH₂-Gruppen in den einzelnen Zuckern und im Aglycon angegeben werden. Durch H/D-Austauschexperimente am peracetylierten Makrolid lassen sich in entsprechender Weise die nicht acetylierbaren OH- oder NH-Gruppen erkennen, zahlenmäßig festlegen und bezüglich des Molekülbereiches lokalisieren.

Auf die Möglichkeit, auch die üblichen chemischen Umwandlungen im Mikromaßstab — z. B. Borhydrid-Reduktion, Mikrohydrierung etc. — durchzuführen mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung der Reaktionsprodukte, sei nur hingewiesen (z. B. Tab.: Aldgamycinol E). Wie wir an den Aldgamycinen beobachteten, erscheint auch in den Umwandlungsprodukten das oben grundsätzlich diskutierte einfache Fragmentierungsverhalten mit nur geringen und bisher nicht deutbaren Änderungen unter Verschiebung der entsprechenden Schlüsselfragmente, solange die Lacton-Gruppierung und damit das makrocyclische Ringsystem nicht gestört sind.

Rinehart²⁾ beobachtete im Massenspektrum des Chalcomycins Fragmente, die offensichtlich durch eine bevorzugte α -Spaltung an der Keton-Gruppe des Makrolacton-Ringes induziert werden. Dieser Befund läßt sich u. E. nicht verallgemeinern. Denn wir fanden, daß die Positionen der einzelnen funktionellen Gruppen im Aglycon (z. B. Keton, Epoxid, Hydroxyl etc.) sich nicht aus der MS-Fragmentierung ableiten lassen.

Auch durch chemische Ionisierung³²⁾ konnte die Fragmentbildung von Makroliden im Hinblick auf die Entstehung neuer strukturspezifischer Ionen kaum verändert werden³³⁾.

Zu günstigeren Resultaten kann man offensichtlich durch *N*-Oxidierung am basischen Zucker gelangen: Im Falle des *N*-Oxid-Derivats von Erythromycin B treten im mittleren Massenbereich zusätzliche Fragmente auf, die definierten Teilen des Aglycons zugeordnet werden³⁴⁾.

Wie das Massenspektrum von Aldgamycin E (Abb. 3) zeigt, liegt ein Makrolid vor, das in glycosidischer Bindung die Monosaccharid-Reste **Z1** (= C₉H₁₃O₅) und **Z2** (= C₈H₁₅O₄) enthält.

Das Fragment **B** erscheint bei *m/e* = 333 (C₂₀H₂₉O₄), so daß sich für das Aglycon die formale Zusammensetzung C₂₀H₃₂O₆ ergibt. Im Massenspektrum des Diacetyl-

³²⁾ F. M. Fied, Accounts Chem. Res. 1, 42 (1968).

³³⁾ L. A. Mitscher, H. D. H. Showalter und R. L. Foltz, J. Antibiot. 26, 55 (1973); L. A. Mitscher, H. D. H. Showalter und R. L. Foltz, J. C. S. Chem. Commun. 1972, 796; R. L. Foltz, Lloydia 35, 344 (1972).

³⁴⁾ L. A. Mitscher, R. L. Foltz und M. I. Levenberg, Org. Mass Spectrom. 5, 1229 (1971).

aldgamybins E (Abb. 4) sind die Schlüsselfragmente der Zucker um jeweils 42 ME nach höherer Masse verschoben, ebenso auch die Fragmente A1 und A2; Beide Zucker besitzen also je eine acetylierbare OH-Gruppe.

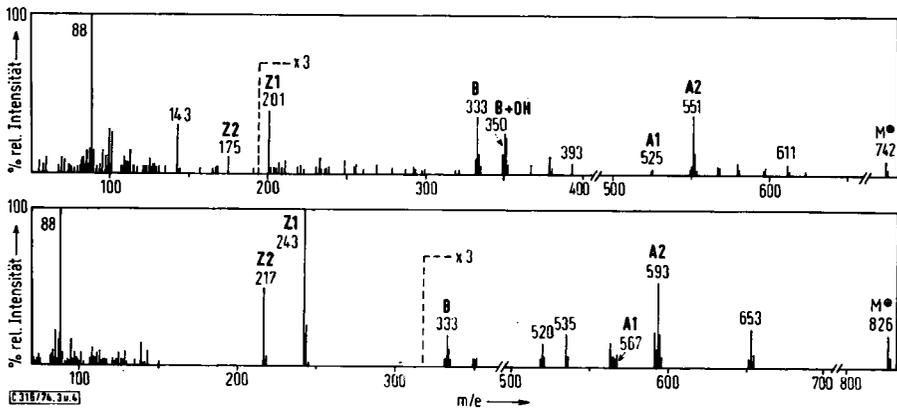


Abb. 3 (oben). Massenspektrum von Aldgamybin E

Abb. 4 (unten). Massenspektrum von Diacetyldalgamybin E

Aus einem H/D-Austauschexperiment am Diacetyl-Derivat läßt sich ableiten, daß keine weiteren OH-Gruppen vorhanden sind.

Durch entsprechende Untersuchungen am Aldgamybin F⁴⁾ ($M^+ = 756.3551$: $C_{37}H_{56}O_{16}$) und am acetylierten Aldgamybin F findet man ebenfalls zwei Zucker-Reste mit den Elementarzusammensetzungen $C_9H_{13}O_5$ und $C_8H_{15}O_4$. Im Aglycon ($C_{20}H_{30}O_7$) läßt sich durch H/D-Austausch eine nicht-acetylierbare OH-Gruppe nachweisen.

Wir sehen den Vorteil massenspektrometrischer Untersuchungen in dieser Substanzklasse hauptsächlich in der minimalen erforderlichen Probenmenge, mit der bereits wesentliche Strukturinformationen gewonnen und als Ausgangspunkt für alle weiteren Strukturaufklärungsexperimente herangezogen werden können.

Die bisherigen Strukturermittlungen an Makroliden zeichnen sich durch einen relativ hohen Materialverbrauch aus, was wohl der Hauptgrund dafür ist, daß die Struktur vieler zu den Makroliden gerechneter Substanzen unaufgeklärt blieb.

Der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemie* danken wir für Sachbeihilfen.

Unser besonderer Dank gilt den Herren Professoren *H. Grisebach* (Univ. Freiburg) und *R. B. Morin* (School of Pharmacy, Univ. of Wisconsin, Madison, Wis., USA) für die Überlassung von Substanzen.

Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden mit einem doppeltfokussierenden Massenspektrometer vom Typ SM 1 B (Fa. Varian-MAT) bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 1000$ aufgenommen. Ionenquelle EH 1, Ionisierungsenergie 70 eV, Temp. der Ionenquelle 220°C, Einlaßsystem: Schubstange; Probentemp. bis 200°C.

Die hochaufgelösten Daten bestimmten wir mit dem SM 1-B nach der „Peak-matching“-Methode bei einer Auflösung von $M/\Delta M = 14000$ (10% Tal).

Herkunft der Substanzen: Aldgamycin E, Aldgamycin F und Chalconmycin sowie deren Derivate wurden gewonnen nach l. c.¹⁾ bzw. l. c.⁴⁾. Aldgamycin C erhielten wir aus Aldgamycin E nach l. c.³¹⁾. Erythromycin A, Carimbose, Carimbose B und Neutramycin wurde uns von Herrn Prof. H. Grisebach (Univ. Freiburg) zur Verfügung gestellt. Oleandomycin lieferte die Fa. Serva (Heidelberg). Tylosin und dessen Abbauprodukte überließ uns freundlicherweise Herr Prof. R. B. Morin (Univ. of Wisconsin, Madison, USA).

[316/74]
