

## ELUCIDATION DE STRUCTURE ET COMPORTEMENT DE PRODUITS NATURELS SOUS IONISATION CHIMIQUE—I

### MISE EN EVIDENCE DE LA CINERUBINE A PAR ETUDE DES DECOMPOSITIONS UNIMOLECULAIRES DES IONS PRODUITS EN PHASE GAZEUSE PAR ${}^1\text{Bu}^+$

L. DAVID et E. SCANZI

Laboratoire de chimie organique biologique, Université de Clermont, ERA 392 CNRS, BP n°45, 63170 Aubiere,  
France

D. FRAISSE

Centre de spectrométrie de masse, service central d'analyses, BP n°22, 69390 Vernaison, France

et

J. C. TABEL\*

Laboratoire de synthèse organique, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, Cédex, France

(Received in France 30 January 1981)

**Résumé**—La spectrométrie de masse par ionisation chimique avec  ${}^1\text{Bu}^+$  est utilisée pour déterminer la structure de l'anthracycline 4915 A. Les décompositions métastables de l'ion moléculaire protoné ( $m/z$  828) ainsi que celles produites par les ions fragments (parties aglycone et hétéroside) montrent que cet antibiotique est la cinérubine A. Les décompositions unimoléculaires produites dans la première région libre de champ sont détectées par les méthodes Linked Scan B/E et B<sup>2</sup>/E.

**Abstract**—Positive ion chemical ionization mass spectrometry by  ${}^1\text{Bu}^+$  is used to determine the structure of anthracycline 4915 A. The metastable decompositions of protonated molecular ion ( $m/z$  828) and fragment ions (aglycone and sugar moieties) show that the antibiotic is cinerubine A. Unimolecular decompositions occurring in the first field-free region are detected by "Linked Scan methods" B/E and B<sup>2</sup>/E.

L'ionisation chimique par protonation est considérée comme une méthode d'ionisation "douce".<sup>1</sup> Elle apporte des informations complémentaires à celles obtenues par impact électronique (IE). En effet sous certaines conditions, l'ionisation chimique produit des ions moléculaires protonés  $[\text{MH}]^+$  stables permettant d'atteindre les masses moléculaires de molécules complexes. L'abondance des ions fragments est d'autant plus faible que l'affinité protonique (AP) du gaz réactif est plus grande comme l'isobutane (AP ~ 815 KJ.mol<sup>-1</sup>) et l'ammoniac (AP ~ 865 KJ.mol<sup>-1</sup>). En ce qui concerne le méthane (AP ~ 530 kJ.mol<sup>-1</sup>), il produit des ions  $[\text{MH}]^+$  de plus faible intensité, étant donné le plus fort transfert d'énergie (correspondant environ aux différences d'affinité protonique entre le gaz réactif et la molécule étudiée). La protonation est produite sur des sites spécifiques comme l'hétéroatome induisant ainsi des fragmentations suffisamment intéressantes pour préciser les structures moléculaires. Un grand nombre d'applications sont rencontrées dans la littérature, tout particulièrement la détermination de séquences de peptides<sup>2,3</sup> et d'oligosaccharides.<sup>4,5</sup>

D'autres méthodes d'ionisation douce<sup>6</sup> comme la désorption de champ<sup>7</sup> et la désorption-ionisation chimique<sup>8</sup> peuvent être utilisées pour mettre en évidence les ions moléculaires (protonés ou non) de trop faible abondance. Toutefois, le courant d'ions obtenus ne reste pas constant et les spectres sont difficilement reproductibles. Une alternative récente à ces méthodes est le bombardement par atome rapide (FAB).<sup>9</sup>

Dans les cas de composés de structures complexes,

soillés par des impuretés difficilement séparables, l'attribution de l'origine des fragments ainsi que leur enchaînement peuvent être alors délicats.

La nouvelle méthodologie que représente la MS/MS introduite par différents groupes dont ceux de McLafferty,<sup>10</sup> de Cooks et Beynon<sup>11</sup> et de Maquestiau<sup>12</sup> est une alternative rendant plus spécifique l'étude d'ions ayant de multiples origines. Elle s'applique quelle que soit l'ionisation utilisée à condition que le courant ionique soit maintenu constant et permet la détermination de la structure d'ions moléculaires dans un mélange ainsi que celle d'ions fragments. Dans le cas d'un instrument double focalisation à géométrie conventionnelle, il est possible d'analyser les décompositions unimoléculaires d'un ion sélectionné, produites dans la première région libre de champ à l'aide des méthodes Linked Scan B/E<sup>13</sup> (spectre à précurseurs constants) et B<sup>2</sup>/E<sup>14</sup> (spectre à "fils" constants). Cette méthode peut être caractérisée par une spécificité supérieure à l'analyse en haute résolution puisque de véritables "empreintes digitales" peuvent être obtenues. C'est ainsi que des isomères peuvent être distingués<sup>15</sup> ainsi que des diastéréoisomères.<sup>16</sup>

Dans ce travail, il s'agit d'étudier la structure d'un produit majoritaire présent dans une fraction d'antibiotiques 4915 obtenue à partir d'une production microbienne.<sup>17</sup> Dans un premier temps, l'approche de la structure de cet antibiotique de la famille des Anthracyclines a été faite à l'aide de méthodes analytiques classiques (chromatographie etc). Tout particulièrement, la résonance magnétique nucléaire montre: (a) la présence de trois groupes-OH phénoliques sur la partie aglycone qui pourrait être l' $\epsilon$  pyrromycinone (ou un isomère); (b) la

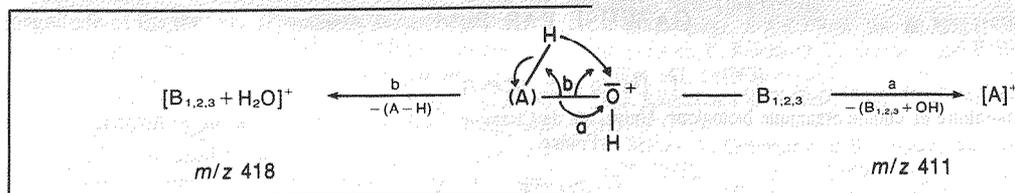
\*Auteur à qui adresser toute correspondance.

stéréochimie des substituants des sucres du fragment hétéroside laissant ainsi présumer de la présence de L-rhodosamine, de 2-désoxy-L-fucose et de cinéroluse A, sans autant connaître leur enchainement.

Cet antibiotique ainsi composé pourrait correspondre à la cinérobine A, c'est dans le but de préciser l'enchainement des fragments (pour confirmer cette

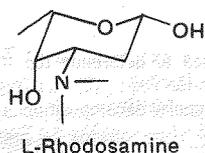
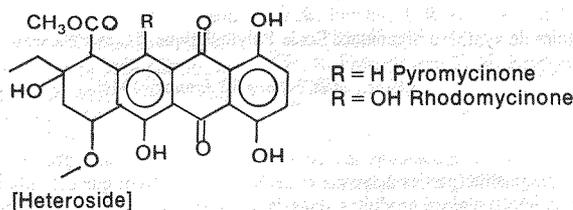
correction de la présence d'isotopes naturels (dûs surtout aux artefacts).<sup>18</sup>

Si la protonation a lieu, entres autres sur l'atome d'oxygène liant les deux fragments principaux de la molécule, la formation des ions  $m/z$  418 et  $m/z$  411 (qui sont complémentaires à un atome d'hydrogène près) peut être interprété comme suit:

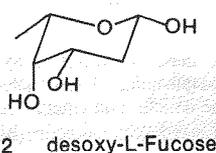


hypothèse) que nous avons été amené à utiliser ces techniques récentes de la spectrométrie de masse.

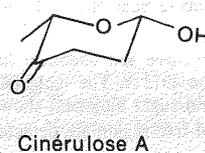
$B_{1,2,3}$  note l'enchainement des sucres où  $B_1$  correspond à celui qui est a proximité du groupe aglycone.



L-Rhodosamine



2 desoxy-L-Fucose



Cinéroluse A

## RESULTATS ET DISCUSSION

Le spectre de masse obtenu par impact électronique de la fraction du mélange d'antibiotiques ne présente aucun pic au-dessus de 400 u et les pics les plus intenses à  $m/z$  95,  $m/z$  113 (pic de base) et  $m/z$  392 (20% du pic de base) émergent de la "forêt" de pics de faible intensité (< 5%). A 15 eV, seuls les ions  $m/z$  113 et  $m/z$  392 subsistent et au-dessus aucun ion n'apparaît (Fig 1a).

Par contre, le spectre de cet échantillon mesuré sous ionisation chimique est caractérisé par un grand nombre de signaux que l'on peut interpréter selon des mécanismes classiques de décompositions. Parmi les pics correspondants aux hautes masses, il faut citer ceux à  $m/z$  770, 784, 786, 803, 810, 812, 827 et 828 dont les intensités relatives sont très faibles (< 5% du pic de base) et difficilement reproductibles même pour l'ion  $m/z$  828 qui est le plus abondant dans cette région (Fig 1b).

Le pic  $m/z$  828 pourrait correspondre à l'ion moléculaire  $MH^+$  produit à partir de la cinérobine A mais aussi à l'ion  $[MH-H_2O]^+$  produit par perte d'eau à partir de l'ion moléculaire protoné de la Marcellomycine ( $m/z$  846). Afin de s'assurer de la masse moléculaire de ce composé majoritaire, le spectre de bombardement rapide d'atomes (FAB, "fast atom bombardment") a été effectué. Il est caractérisé par la présence du pic très intense à  $m/z$  828 qui confirme nos précédents résultats.

### Décomposition unimoléculaire de l'ion $MH^+$ ( $m/z$ 828)

L'ion  $m/z$  828 produit par  $iC_4H_9^+$  se décompose spontanément pour conduire aux ions suivants:  $m/z$  810 (70%), 418(5%), 411 (14%) 400 (3%) et 393 (8%). Ainsi la perte d'une molécule d'eau est la plus importante. Les abondances relatives ont été normalisées à 100% après

Ainsi ces ions sont formés soit par rupture simple pour donner l'ion  $[A]^+$  ( $m/z$  411) soit par migration d'un atome d'hydrogène suivi d'une rupture de la liaison (A)-O pour donner l'ion hétérosidique  $[B_{1,2,3} + H_2O]^+$  ( $m/z$  418).

Enfin, la formation des ions  $B_{1,2,3}^+$  ( $m/z$  400) et  $[A-H_2O]^+$  ( $m/z$  393) s'interprète par l'élimination d'une molécule d'eau à partir respectivement des fragments hétéroside  $[B_{1,2,3} + H_2O]^+$  ( $m/z$  418) et aglycone  $[A]^+$  ( $m/z$  411).

Ces résultats indiquent que cette perte rapide d'eau est consécutive à la formation des ions  $m/z$  418 et 411 dans la première région libre de champ. Un tel comportement se retrouve dans le spectre conventionnel IC avec  $^iBu^+$  de l'échantillon pur de cinérobine A (Fig 2). L'ion  $m/z$  828 étant de très faible abondance, il n'a pas été possible de tenter une étude analogue sur l'échantillon pur de cinérobine A (en trop faible quantité).

### Décompositions spontanées des fragments aglycones $[A]^+$ ( $m/z$ 411) et $[A-H_2O]^+$ ( $m/z$ 393)

Il est possible d'interpréter la formation des ions fragments lors des décompositions unimoléculaires des ions  $[A]^+$  et  $[A-H_2O]^+$  sur la base d'une structure  $\epsilon$  pyromycinone (ou isomère) pour le fragment aglycone.

En effet, l'étude du spectre "Linked Scan"  $B^2/E$  de l'ion  $m/z$  393  $[A-H_2O]^+$  confirme que seul l'ion  $m/z$  411 en est le précurseur. Inversement, le spectre en mode B/E de ce dernier, présente principalement un signal à  $m/z$  393 à côté de 378 et 377 comme l'indique le Tableau 1.

Ces deux derniers ions sont produits respectivement par élimination consécutive à celle d'une molécule d'eau, soit d'une molécule de méthane, soit d'un radical  $CH_3$ . Il est difficile d'apporter une interprétation satisfaisante à

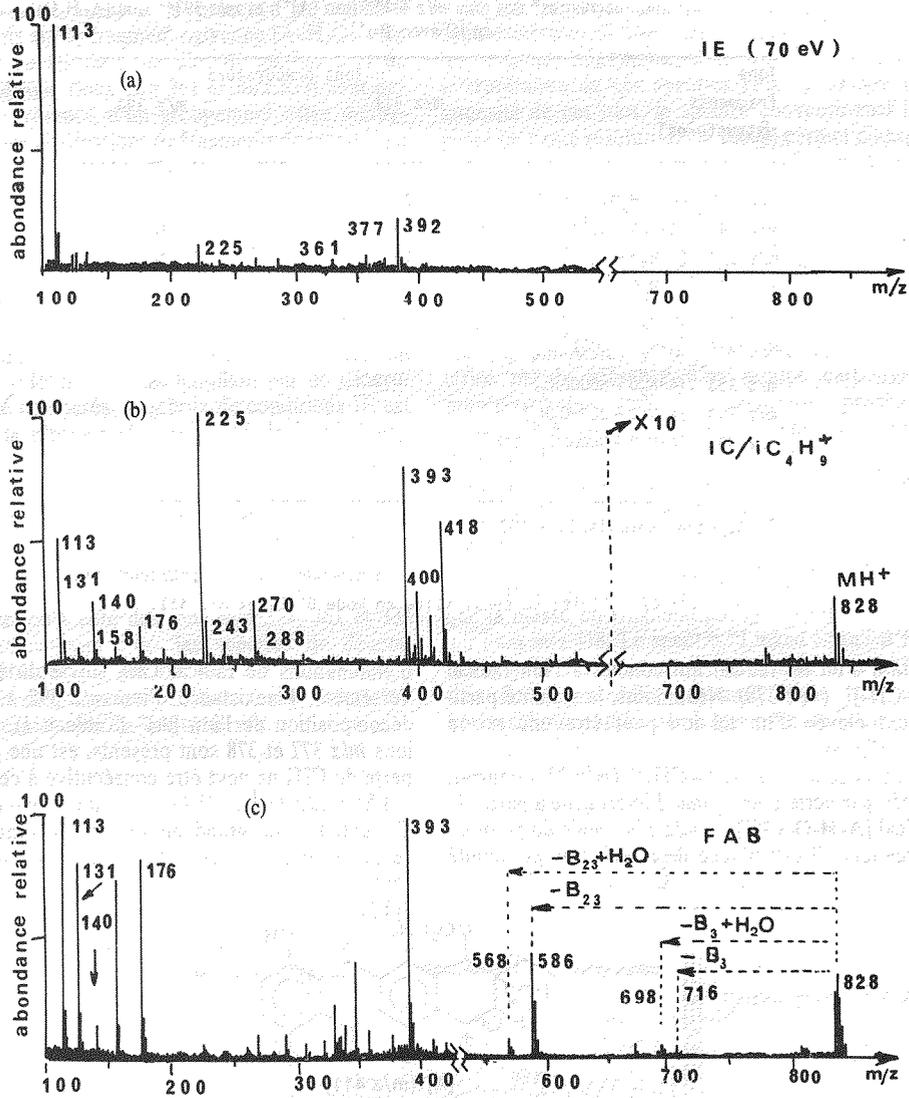


Fig. 1. Spectre de la fraction d'antibiotique 4915 obtenu (a) sous impact électronique (70 eV); (b) sous ionisation chimique avec  ${}^t\text{Bu}^+$  (c) sous bombardement d'atome rapide.

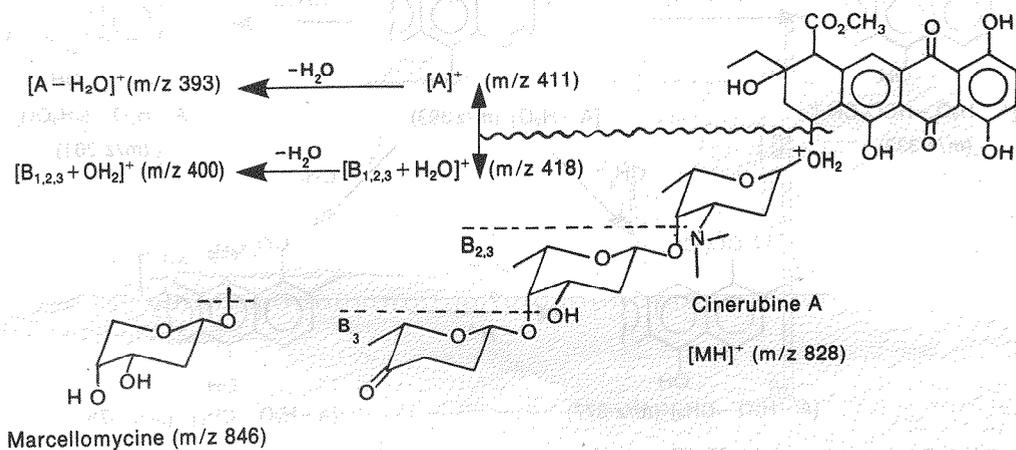


Fig. 2. Décompositions de l'ion moléculaire protoné  $[\text{MH}]^+$  ( $m/z\ 828$ ) de la cinérubine A.

Tableau 1. Décompositions unimoléculaires\* des ions  $m/z$  411\*\* (ion  $[A]^+$ ), et  $m/z$  393\*\* (ion  $[A-H_2O]^+$ ) produits en IC avec  $^1Bu^+$ 

Ions fragments [structures]	Ions précurseurs	
	$m/z$ 411	$m/z$ 393
$m/z$ 393 $[A - H_2O]^+$	78	-
$m/z$ 392 $[A-H_2O - H]^+$	-	58
$m/z$ 378 $[A-H_2O - CH_3]^+$	12	10
$m/z$ 377 $[A-H_2O - CH_4]^+$	10	6
$m/z$ 361 $[A-H_2O - CH_3OH]^+$	-	12
$m/z$ 337 $[A-H_2O - 2CO]^+$	-	2
$m/z$ 333 $[A-H_2O - HCOOCH_3]^+$	-	5
$m/z$ 309 $[A-H_2O - 2CO - C_2H_4]^+$	-	6
$m/z$ 305 $[A-H_2O - HCOOCH_3 - CO]^+$	-	1

\* Spectres normalisés à 100 %

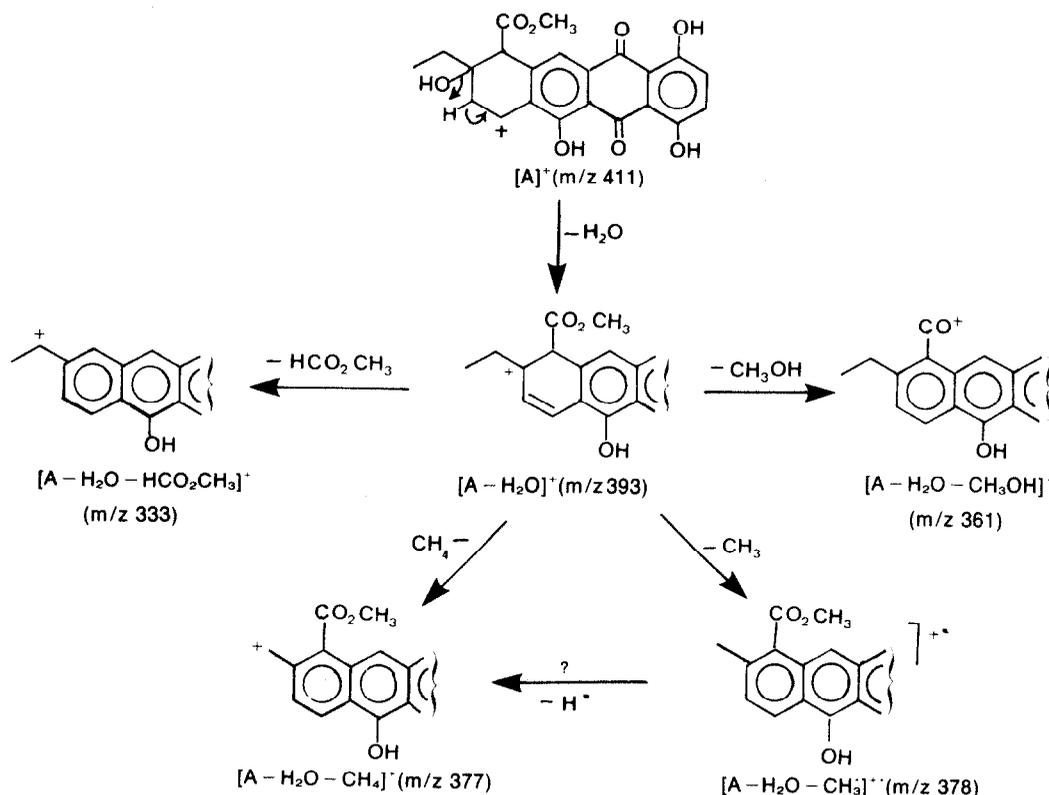
\*\* Les ions  $m/z$  411, et  $m/z$  393 ont respectivement comme précurseurs les ions  $m/z$  429 (limite de sensibilité en mode  $B^2/E$ ) et  $m/z$  411.

l'élimination d'un tel radical qui conduit à l'ion radical  $[A-H_2O-CH_3]^+$  ( $m/z$  378). Néanmoins, la stabilité particulièrement élevée d'un tel ion peut être une raison suffisante (Fig. 3).

Une partie des ions  $[A-H_2O-CH_4]^+$  ( $m/z$  377) pourrait être formée par perte d'un atome d'hydrogène à partir de l'ion radical  $[A-H_2O-CH_3]^+$  ( $m/z$  378), mais du point de vue énergétique, il est difficile de retenir une possibilité

d'éliminations de radical  $CH_3$  suivie du radical  $H$ . Inversement, l'inexistence d'ion  $m/z$  392 au cours de la décomposition de l'ion  $[A]^+$  (Tableau 1), alors que les ions  $m/z$  377 et 378 sont présents, est une preuve que la perte de  $CH_3$  ne peut être consécutive à celle de  $H$ .

L'ion  $m/z$  393  $[A-H_2O]^+$  conduit (comme le montre le Tableau I) à un grand nombre de décompositions consécutives dans la première région libre de champ qui

Fig. 3. Décompositions consécutives du fragment aglycone  $\epsilon$ -pyromycinone dans la première région libre de champ.

sont utiles pour reconnaître la présence de certains groupes présents sur le fragment aglycone  $[A-H_2O]^+$ . En particulier, les pertes de molécules de méthanol et de formiate de méthyle (ions  $m/z$  361 et  $m/z$  333) sont des preuves de la présence d'un groupement ester méthylique. De plus, les éliminations de fragments de masse 56 u et 84 u ne sont pas incompatibles avec la présence soit de groupe quinone, soit de groupe phénol. Néanmoins, il n'est pas possible, malgré ces présomptions, de s'assurer d'une structure  $\epsilon$ -pyrrromycinone pour le fragment aglycone.

Pour lever cette incertitude, les spectres de décompositions unimoléculaires des ions  $m/z$  392 formés sous impact électronique (70 eV) à partir de la fraction d'antibiotique 4915 A et de l'échantillon pur de Cinéribine A, ont été comparés. Le choix de conditions IE est surtout dû à la plus grande sensibilité de la méthode, compte-tenu que trop peu d'échantillon pur était disponible.

Les spectres "Linked Scan B/E" des ions  $m/z$  392 ainsi enregistrés sont pratiquement superposables ce qui permet d'assurer l'identité de ces structures (Figs 4a, b).

Il faut noter, qu'à côté des ions  $m/z$  377, 361 et 333 présents communément dans les spectres de décompositions unimoléculaires des ions  $m/z$  393 (IC avec  $^1\text{Bu}^+$ ) et 392 (IE à 70 eV), la présence d'ions à  $m/z$  364 et  $m/z$  336 pour ce dernier spectre sont observés.

De tels ions sont les témoins de l'élimination d'une ou deux molécules de CO, mais, il reste difficile de préciser leur origine. Néanmoins, il est possible de donner une interprétation de ces spectres (Fig 5). Malgré la faible intensité de ces pics, le spectre conventionnel IE enregistré en haute résolution ( $> 10000$ ) permet d'assurer que les ions isobars qui seraient produits lors de l'élimination de  $\text{C}_2\text{H}_4$  et de  $(\text{CO} + \text{C}_2\text{H}_4)$  ne sont pas présents.

#### Décomposition du fragment hétérosidique

Parmi les antibiotiques de la famille anthracycline, on peut citer pour être constitués d'une telle partie aglycone, la *cinéribine A* (dont le sucre terminal est caractérisé par la présence d'un groupe carbonyle) et la *marcellomycine* (qui, au contraire, possède deux groupements hydroxyles sur le dernier sucre) (Fig. 1). La distinction entre ces deux antibiotiques est d'autant plus délicate que la *marcellomycine* conduit, par perte d'une molécule d'eau, à un énol de masse identique à celle de la *cinéribine A*. Toutefois, l'assurance que l'ion  $m/z$  828 est bien l'ion moléculaire protoné, et que l'ion  $m/z$  411 correspond bien à la partie aglycone, permet d'envisager que la masse du fragment  $[\text{B}_{1,2,3} + \text{H}_2\text{O}]^+$  est représenté par l'ion  $m/z$  418. Le spectre "Linked Scan"  $\text{B}^2/\text{E}$  de cet ion ne présente aucun précurseur situé à  $m/z$  436. Ainsi, une forte probabilité apparaît pour que la partie hétérosidique soit la même que celle de la cinéribine A.

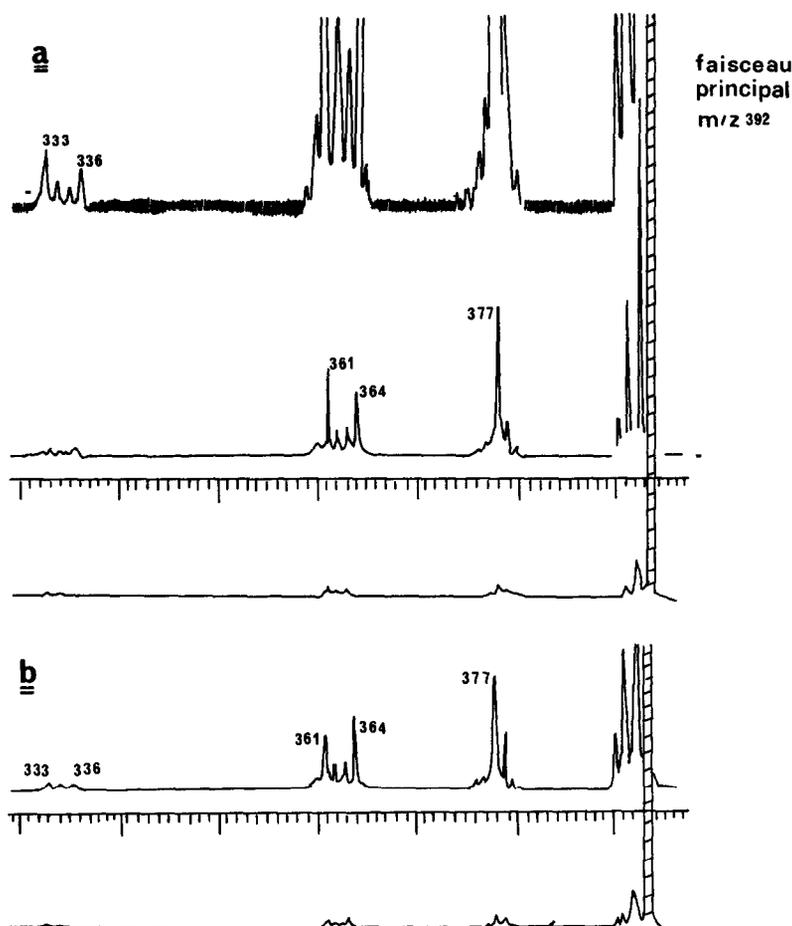


Fig. 4. Spectre "Linked Scan" B/E des ions  $m/z$  392 produits sous IE (70 eV) à partir (a) de la fraction d'antibiotique; (b) d'un échantillon pur de la cinéribine A.

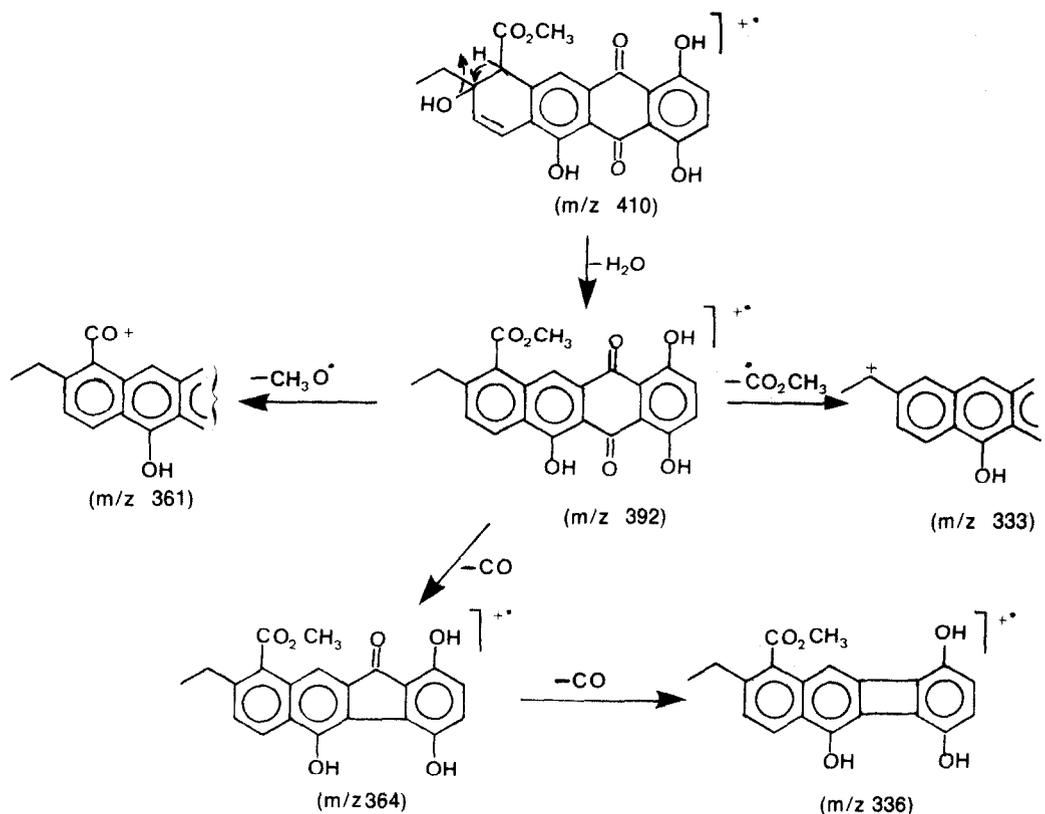


Fig. 5. Décompositions consécutives de l'ion  $m/z$  392 formé à partir de l'ion  $m/z$  410, produits sous IE (70 eV).

Tableau 2. Spectre\* de décompositions unimoléculaires dans la première région libre de champ de l'ion  $[\text{B}_{1,2,3} + \text{H}_2\text{O}]^+$  ( $m/z$  418)

$m/z$	Intensité	Structures possibles	$m/z$	Intensité	Structures possibles
400	32	$[\text{B}_{1,2,3}]^+$	225	12	$[\text{B}_{2,3} - \text{H}_2\text{O}]^+$
355	7	$[\text{B}_{1,2,3} - \text{HNMe}_2]^+$			$[\text{B}_{1,2} - \text{H}_2\text{O} - \text{HNMe}_2]^+$
338	4	$[\text{B}_{1,2,3} - \text{HNMe}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+$	197	3	-
306	3	$[\text{B}_{1,2} + \text{H}_2\text{O}]^+$	164	6	-
288	1	$[\text{B}_{1,2}]^+$	158	5	$[\text{B}_1]^+$
270	6	$[\text{B}_{1,2} - \text{H}_2\text{O}]^+$	131	2	$[\text{B}_3 + \text{H}_2\text{O}]^+$ , $[\text{B}_1]^+$
261	3	$[\text{B}_{2,3} + \text{H}_2\text{O}]^+$			$[\text{B}_1 + \text{H}_2\text{O} - \text{HNMe}_2]^+$
252	9	$[\text{B}_{1,2} - 2\text{H}_2\text{O}]^+$	113	1	$[\text{B}_3]^+$ , $[\text{B}_1\text{HNMe}_2]^+$
243	1	$[\text{B}_{2,3}]^+$			$[\text{B}_2 - \text{H}_2\text{O}]^+$
			95	5	$[\text{B}_3 - \text{H}_2\text{O}]^+$ , $[\text{B}_2 - 2\text{H}_2\text{O}]^+$
					$[\text{B}_1 - \text{H}_2\text{O} - \text{HNMe}_2]^+$

\* Le spectre est normalisé à 100 %. Les pics dus aux artefacts ne sont pas notés. Ceux-ci sont liés à la présence des ions isotopes naturels de l'ion  $m/z$  418.

Il reste à montrer un enchaînement cohérent avec une telle hypothèse.

L'analyse du spectre "Linked Scan" B/E de l'ion  $[\text{B}_{1,2,3} + \text{H}_2\text{O}]^+$  ( $m/z$  418) permet d'attribuer l'origine d'un grand nombre d'ions fragments, présents dans le spectre conventionnel IC avec  ${}^t\text{Bu}^+$  (Tableau 2).

Ainsi, les décompositions unimoléculaires consécutives (produites dans la première région libre de champ) de l'ion  $m/z$  418 permettent d'avoir une "vue d'ensemble" sur les ions qui en dérivent selon de multiples générations, mais il reste parfois difficile d'attribuer une "filiation de parenté" entre certains d'entre eux. Afin de la

déterminer, la mesure de spectre "Linked Scan"  $B^2/E$  de ceux-ci a été effectuée systématiquement quand ils étaient suffisamment abondants dans le spectre conventionnel (Tableau 3). Ces résultats montrent que la plupart de ces ions possèdent deux à trois précurseurs qui peuvent—soit dériver l'un de l'autre par perte de molécule neutre ( $H_2O$ ,  $HNMe_2$ ) comme par exemple les précurseurs des ions  $m/z$  355, 306, 270 et 176; soit n'avoir aucune relation (sinon l'ion d'origine  $m/z$  418) en particulier comme les ions "pères" de l'ion  $m/z$  288:  $m/z$  306 et 400. Les ions  $m/z$  400, 243, 158 et 95 sont *uniquement* produits par perte d'une molécule d'eau chacun à partir d'un ion précurseur homologue de 18 u.

*Etude des fragments*  $[B_1]^+$ ,  $[B_2]^+$  et  $[B_3]^+$ . Il est possible compte tenu de ces résultats d'obtenir une approche de structure des ions hétérocycliques  $[B_1]^+$ ,  $[B_2]^+$  et  $[B_3]^+$  (à la stéréochimie près) ainsi que celles de leurs homologues. Ces ions sont formés à partir des ions  $[B_{2,3}]^+$  (ou  $[B_{2,3} + H_2O]^+$ ) et  $[B_{1,2}]^+$  (ou  $[B_{1,2} + H_2O]^+$ ).

Sachant qu'il est difficile d'apprécier a priori la répartition des sites oxygénés (ou azotés) protonés, et qu'il existe des migrations de proton, l'interprétation donnée à certaines transitions métastables ne peut en rien préjuger des centres réellement protonés qui induisent et orientent les fragmentations pour donner des ions isomères. Néanmoins, il reste possible de connaître les composants de chacun des disaccharides  $[B_{2,3}]^+$  et  $[B_{1,2}]^+$  (Fig. 6).

S'il a pu être possible de lever certaines ambiguïtés quant aux origines multiples (ou non) des ions  $m/z$  306, 288, 270, 243, 176, 158 et 95, il reste délicat a priori de préciser les origines effectives des ions  $m/z$  113 et 131,

d'autant plus que ces ions étudiés ne reflètent pas pour autant le comportement de ceux qui sont donnés dans la source et qui ont une plus forte énergie interne.

A priori, l'ion  $m/z$  131 pourrait représenter les trois structures isomères:  $[B_3 + H_2O]^+$ ,  $[B_2]^+$  et  $[B_1 + H_2O - HNMe_2]^+$ ; toutefois, comme les ions  $m/z$  243 et 288 en sont les précurseurs (Tableau 3), il faut noter que (a) le précurseur  $[B_{1,2}]^+$  ( $m/z$  288) conduit directement à l'ion  $m/z$  131 en lui conférant une structure uniquement du type  $[B_2]^+$ ; il n'est pas possible d'envisager une structure  $[B_1 + H_2O - HNMe_2]^+$  puisque  $[B_1 + H_2O]^+$  ( $m/z$  176) qui en est le précurseur, n'est pas produit par l'ion  $m/z$  288; et (b) Le second précurseur étant l'ion  $[B_{2,3}]^+$  ( $m/z$  243), la seconde structure de l'ion  $m/z$  131 sera du type  $[B_3 + H_2O]^+$ .

Cette dernière est majoritaire puisqu'il est formé pour 93% à partir de l'ion  $[B_{2,3}]^+$  et son isomère pour 7% par décomposition de  $[B_{1,2}]^+$ . L'étude des spectres de décompositions spontanées des ions  $m/z$  176, 158, 131 et 113 (tous d'intensité non négligeable dans la source) confirme ce qui précède (Tableau 4). Pour ne citer qu'un exemple, la présence du groupe diméthylamino est mise en évidence par la perte, dans l'ion  $m/z$  158  $[B_1]^+$ , d'un fragment de 45 u pour donner l'ion  $m/z$  113  $[B_1 - HNMe_2]^+$ , celle d'une molécule d'eau est détectée par la présence de l'ion  $m/z$  140  $[B_1 - H_2O]^+$ . En général, les éliminations successives sont du type 1-2 ce qui reste à démontrer par des marquages ou par l'étude spécifique des fragments sous collisions.

Ces décompositions étant produites dans la première région libre de champ, l'obtention de ces transitions

Tableau 3. Principaux précurseurs des ions fragments produits à partir du fragment hétérosidique

Ions fragments (intensité source)	Ions précurseurs * (intensité métastable)
400 (14,5)	418 (100)
355 (< 1)	400 (95) 418 (5)
306 (3)	418 (15) 400 (95)
288 (2,1)	306 (90) 400 (10)
270 (26)	288 (92) 306 (8)
261 (4)	**
252 (< 1)	**
243 (12)	261 (100)
225 (100)***	261 (10) 243 (85) 288 (5)
158 (8)	176 (100)****
140 (80)	158 (70) 225 (30)
131 (4)	288 (7) 243 (93)
113 (45)	131 (75) 225 (5) 243 (20)
95 (4)	113 (100)

\* abondances normalisées à 100% (hauteur de pic)

\*\* pics où aucun précurseur n'apparaît (limite de sensibilité)

\*\*\* sous impact électronique, l'ion  $m/z$  225 possède un autre précurseur: l'ion  $m/z$  270

\*\*\*\* il n'a pas pu être mis en évidence d'ion précurseur pour  $m/z$  176 (limite de sensibilité)

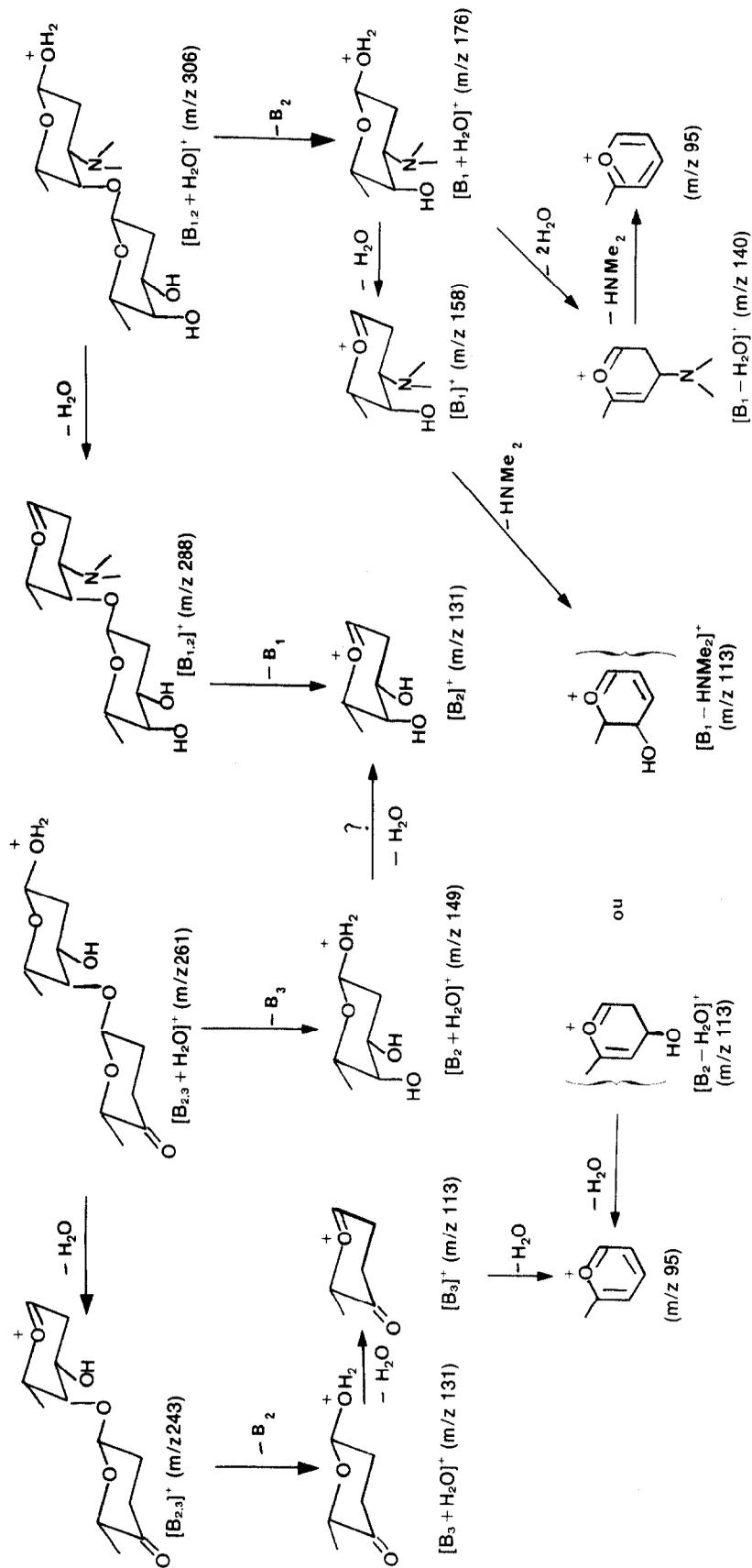


Fig. 6. Décompositions consécutives des ions fragments hétérosides:  $[B_{2,3}+H_2O]^+$  ( $m/z$  261) et  $[B_{1,2}+H_2O]^+$  ( $m/z$  306) produits à partir de l'ion  $[B_{1,2,3}+H_2O]^+$  ( $m/z$  418).

Tableau 4. Spectre\* de décompositions unimoléculaires des ions  $B_{1,2}^+$  ( $m/z$  288),  $[B_{2,3} + H_2O]^+$  ( $m/z$  261) et de leurs principaux ions fragments

Ions précurseurs (intensité source) <sup>✱</sup>	Ions fragments (intensité dans la première région métastable)				
$m/z$ 288 $[B_{1,2}]^+$ (2)	270(70)	252(16)	243(3)	225(6)	207(5)
$m/z$ 270 $[B_{1,2}-H_2O]^+$ (26)	252(51)	225(20)	140(8)	131(2)	113(19)
$m/z$ 261 $[B_{2,3}+H_2O]^+$ (4)	243(58)	225(30)	131(4)	113(8)	
$m/z$ 252 $[B_{1,2}-2H_2O]^+$ (<1) <sup>✱✱</sup>	207(100)				
$m/z$ 243 $[B_{2,3}]^+$ (12)	242(65)	225(15)	197(2)	131(8)	113(5)
$m/z$ 225 (100)	207(21)	197(9)	179(7)	165(4)	131(2)
	113(36)	97(19)	95(2)		
$m/z$ 176 $[B_1 + H_2O]^+$ (13)	158(72)	140(2)	113(68)		
$m/z$ 158 $[B_1]^+$ (8)	140(32)	113(68)			
$m/z$ 140 $[B_1 - H_2O]^+$ (20)	95(100)				
$m/z$ 131 $[B_3 + H_2O]^+$ (4)	113(100)				
$m/z$ 113 $[B_3]^+$ (45)	95(100)				

spectres normalisés à 100%

\* spectres normalisés par rapport au pic de base à  $m/z$  411

\*\* ion de faible abondance et mesuré aux limites de la sensibilité

métastables permet donc la détermination des substituants des ions étudiés.

*Décomposition des fragments  $[B_{1,2}]^+$  et  $[B_{2,3}]^+$  disaccharides.* Une même étude (Tableau 4) menée sur les ions  $m/z$  288, 270, 261, 243 et 225 permet de retrouver les précédents résultats dont la présence du groupe diméthylamino mais aussi celle du groupement carbonyle. N'ayant que de très faibles quantités de cinérubine A, pure toute comparaison entre les spectres de décomposition unimoléculaire ont été abandonnées.

L'élimination de fragment neutre de 45 u à partir des ions  $m/z$  270  $[B_{1,2}-H_2O]^+$  et  $m/z$  252  $[B_{1,2}-2H_2O]^+$  (qui en dérivent)-ce qui n'est pas le cas des ions  $m/z$  261  $[B_{2,3} + H_2O]^+$  et  $m/z$  243  $[B_{2,3}]^+$  confirme la présence du groupe "diméthylamino" sur ces fragments. Ils conduisent ainsi à la formation des ions  $[B_{1,2}-H_2O-HNMe_2]^+$  ( $m/z$  225) et  $[B_{1,2}-2H_2O-HNMe_2]^+$  ( $m/z$  207). Il reste donc à mettre en évidence le groupe carbonyle sur  $B_3$  et le groupe hydroxyle sur  $B_2$  (Fig 7).

L'analyse des décompositions de l'ion  $m/z$  225 permet de les mettre en évidence. En effet, le spectre "Linked Scan" B/E de l'ion  $m/z$  225 (Tableau 4) présente deux pics à  $m/z$  207 et 197 correspondant respectivement à la perte d'une molécule d'eau et d'une molécule de CO. De telles éliminations doivent être des témoins de structures des ions qui les produisent.

Toute la question est de savoir, si les ions  $m/z$  225 possèdent une structure unique qui permet une telle élimination d'eau et de monoxyde de carbone de manière compétitive, ou deux structures isomères, l'une conduisant à la perte d'eau et l'autre à celle de CO.

La recherche des précurseurs de l'ion  $m/z$  225 (Tableau 3) indique que les ions  $m/z$  243  $[B_{2,3}]^+$  et  $m/z$  288  $[B_{1,2}]^+$  le sont. Inversement, ces ions donnent évidemment les ions  $m/z$  225 qui seraient donc obligatoirement des ions isomères:  $[B_{2,3}-H_2O]^+$  et  $[B_{1,2}-H_2O-$

$HNMe_2]^+$ . Toutefois, les ions  $m/z$  207 et 197 ne possèdent pas cette double origine puisqu'ils sont respectivement produits à partir des ions  $m/z$  288  $[B_{1,2}]^+$  et 243  $[B_{2,3}]^+$  de façon spécifique. L'ion  $m/z$  243 est produit en très faible quantité à partir de l'ion  $m/z$  288 (par perte de  $HNMe_2$ ) (Table 4). Ce résultat est vérifié lors de la recherche des précurseurs de l'ion  $m/z$  243 (Tableau 3). En effet, l'ion  $m/z$  288 ne semble pas y conduire, et seul l'ion  $m/z$  261 le forme par perte d'eau. Ainsi, il ne peut y avoir d'interférences entre ces origines.

Ainsi, s'il est difficile d'interpréter a priori la perte compétitive de  $H_2O$  et de CO des ions  $m/z$  225, l'utilisation des *décompositions consécutives* dans la première région libre de champ conduit directement à la solution.

En effet dans cette région (a) les ions  $[B_{2,3}]^+$  ( $m/z$  243) et  $[B_{1,2}]^+$  ( $m/z$  288) conduisent tous deux, par une élimination d'eau, aux ions  $[B_{2,3}-H_2O]^+$  ( $m/z$  225) et  $[B_{1,2}-H_2O]^+$  ( $m/z$  270); (b) ce dernier se décompose très rapidement pour donner l'ion  $m/z$  225  $[B_{1,2}-H_2O-HNMe_2]^+$  par perte de  $HNMe_2$ . L'ion  $m/z$  270 dérivant de l'ion  $m/z$  288 par perte d'eau possède un comportement analogue puisque les ions  $m/z$  225 et 207 sont produits par celui-ci, sans aucune trace d'ion  $m/z$  297.

Les ions  $m/z$  225 de structures isomères ont le temps de se fragmenter en éliminant soit une molécule d'eau, soit une molécule de monoxyde de carbone. La présence d'un groupe alcool éthylénique dans  $[B_{1,2}-H_2O-HNMe_2]^+$  et d'un groupe carbonyle dans  $[B_{2,3}-H_2O]^+$  explique donc ces résultats (Fig 7).

Ainsi, il est possible de mettre en évidence et confirmer les substituants de chacun de ces sucres (qui étaient connus par ailleurs) et prouver leur enchaînement dans le fragment hétéroside grâce aux *décompositions unimoléculaires consécutives* qui ont l'avantage d'être spécifiques.

Ce enchaînement a pu être récemment confirmé lors

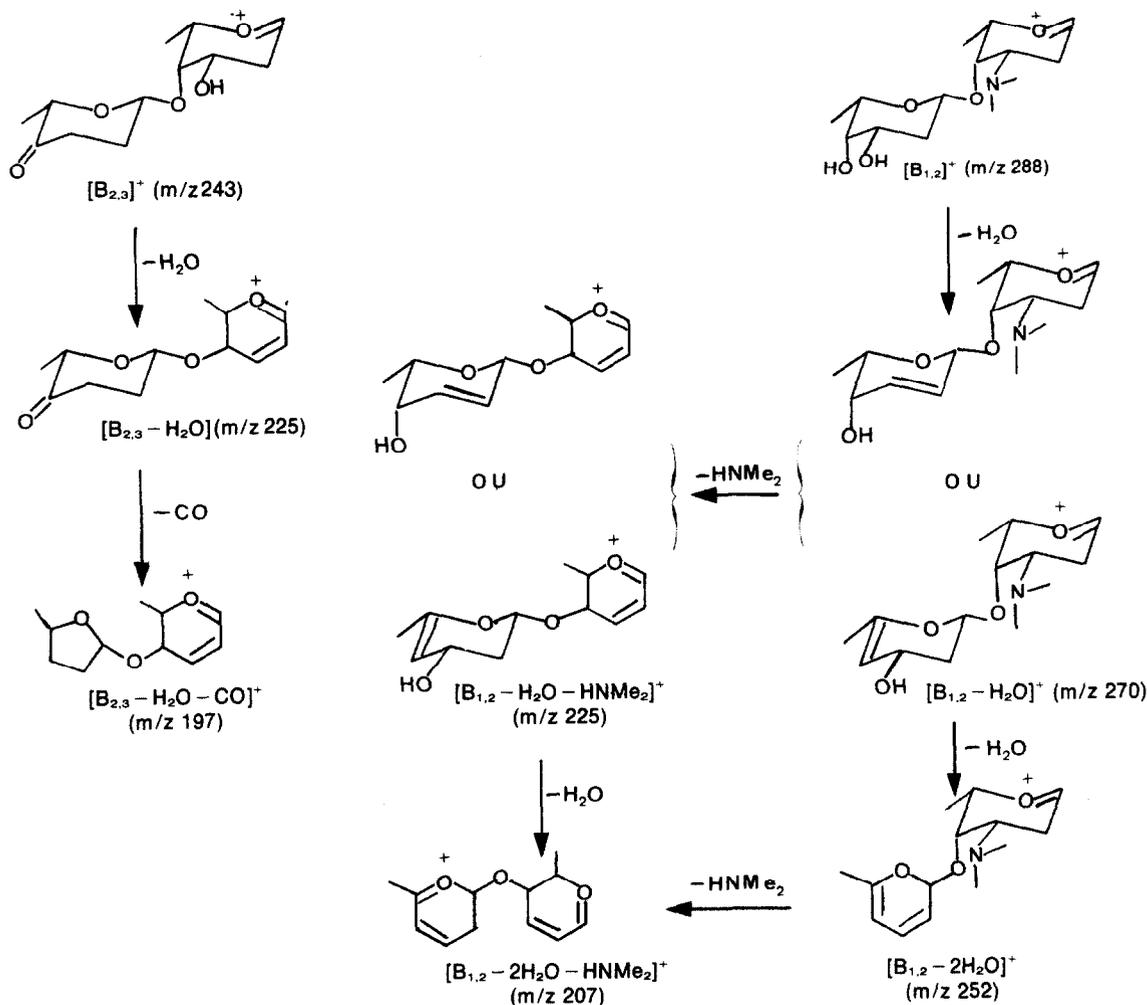


Fig. 7. Décompositions consécutives des ions  $[B_{2,3}]^+$  ( $m/z$  243) et  $[B_{1,2}]^+$  ( $m/z$  288) conduisant aux ions isomères  $m/z$  225:  $[B_{2,3}-H_2O]^+$  et  $[B_{1,2}-H_2O-HNMe_2]^+$ .

de l'étude du spectre de décomposition unimoléculaire de l'ion  $m/z$  828 (produit selon la technique FAB). Ce spectre est enregistré sur un instrument à géométrie inversée ZAB 2F selon le mode MIKE (mass analysed ion kinetic energy). En effet, les ions moléculaires protonés ainsi formés se décomposent pour éliminer des fragments neutres correspondant justement aux pertes du sucre terminal  $B_3$  (112 u et 130 u) et des deux derniers sucres  $B_{2,3}$  (242 u et 260 u) pour donner les ions  $m/z$  716, 698, 586 et 568. Il faut noter un comportement différent pour les ions  $MH^+$  produits en IC avec  $^tBu^+$  qui ne présentent (spectre B/E) que les deux ions fragments principaux  $m/z$  411 et 418, sans faire apparaître la perte des sucres terminaux.

#### CONCLUSION

Malgré la forte affinité protonique de l'isobutane, les fragmentations de l'antibiotique 4915 A restent nombreuses et abondantes au "détriment" de l'ion moléculaire protoné  $[MH]^+$  ( $m/z$  828). L'utilisation de la technique FAB sur ces composés non dérivés a permis de confirmer la masse moléculaire. La mesure des spectres de décompositions unimoléculaires de cet ion, en mode B/E, permet de mettre en évidence la partie aglycone et

la partie hétérosidique de masse respective  $m/z$  411 et 400 (avec l'isobutane).

L'étude des décompositions consécutives (produites dans la première RLC) de l'ion  $m/z$  393 précise la nature de substituants: éthyle, carbométhoxy, quinone etc. De telles présences sont confirmées sur l'ion  $m/z$  392 (produit sous impact électronique) qui conduit, au cours de ces fragmentations métastables, à des ions radicaux très stabilisés. C'est ainsi qu'a pu être précisée la structure  $\epsilon$ -pyrromycinone pour la partie aglycone.

De la même manière, la MS/MS donne, par sa spécificité, l'enchaînement des sucres (dont les structures étaient déjà connues) dans le fragment hétérosidique: cinérolucose A (sucre terminal), 2 - désoxy - L - fucose, L-rhodamine (sucre lié à l' $\epsilon$ -pyrromycinone). Une telle détermination a été rendue possible grâce à l'utilisation de décompositions unimoléculaires consécutives dans la première région libre de champ. Cette dernière méthodologie est très intéressante quand il s'agit de distinguer les origines de certains ions (ions isobars) formés à partir d'ions isomères; ceux-ci pouvant être eux-mêmes produits par décompositions unimoléculaires, de différents précurseurs. Ainsi, l'étude des décompositions consécutives spontanées des ions précurseurs

$[B_{1,2}]^+$  ( $m/z$  288) et  $[B_{2,3}]^+$  ( $m/z$  243) permet de lever l'ambiguïté quant à l'origine des ions de seconde génération  $m/z$  207 et 197 qui sont formés par des ions communs  $m/z$  225 de structures isomères. Cette méthode complète avantageusement les résultats éventuellement insuffisants obtenus lors de l'étude des spectres Linked Scan B<sup>2</sup>/E. La description de ces véritables "cartes généalogiques" est utilisée pour déterminer la structure d'autres antibiotiques.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

##### Production de cinérubines

Le mycélium congelé de la souche *Streptomyces Griseorubiginosus* est inoculé dans 100 ml de milieu contenant 3% de glucose; 0.5% de farine de soja; 0.5% de corn-steep et 0.5% de CaCO<sub>3</sub>. Le pH est ajusté à 7.2 avant stérilisation. Après 24 h d'incubation à 27°C dans une secoueuse à mouvement rotatif, on met 100 ml de ce milieu ensemencé dans un fermenteur de 2 litres, contenant 1 litre du même milieu. Après incubation pendant 24 h, avec agitation à 400 tours/minute et une aération de 0.5 v/v/min, la culture est transférée dans un fermenteur de 20 litres contenant 15 litres de milieu composé de 3% de saccharose; 1.5% de corn-steep; 0.2% de NaCl; 0.01% de FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0.01% de ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O et 0.075% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Le pH est ajusté à 7.2 avant stérilisation. La fermentation dure 3 à 4 jours, à 27°C avec agitation. Le volume d'oxygène dissous est de 90%.

##### Isolement et purification des cinérubines

Les cinérubines sont extraites du mycélium, obtenu par agitation continue avec le chlorure de méthylène. Les extraits sont concentrés sous vide et les antibiotiques sont précipités après addition d'hexane. Une première séparation est effectuée par chromatographie sur colonne (support gel de silice 60 Merck, 70-230 Mesh ASTM et éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>-acétone-hexane-CH<sub>3</sub>OH: 30/10/2/2). Une dernière purification a lieu par chromatographie sur plaque (gel de silice 60, PF<sub>254+366</sub> Merck, même éluant).

##### Spectre de masse

Les spectres sont effectués sur spectromètre de masse VG 7070 muni d'une source mixte IE/IC, couplée avec un ordinateur PDP8 (Data système 2000) pour le traitement des données des spectres conventionnels. Le plasma réactif est caractérisé par une pression isobutane de l'ordre de 0.5 torr. Il est produit à l'aide d'un bombardement électronique de 100 eV. Le courant d'ions est réglé sous 500 μA. Les ions sont accélérés par une tension de 3 kV. La température de la source est de 230 C. Une sonde d'introduction directe (munie d'un chauffage) est utilisée

pour introduire l'échantillon. La température de la sonde évolue lentement de 150 C à 230 C. Les spectres FAB ont été effectués à l'aide d'une source construite par la société VG Manchester sur un instrument ZAB 2F. Les décompositions unimoléculaires d'un ion donné sont détectées selon le mode Linked Scan B/E et les précurseurs de celui-ci sont obtenus à l'aide du mode B<sup>2</sup>/E, par pilotage automatique des champs B et E, ainsi qu'avec le mode MIKE.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup>D. F. Hunt et S. K. Sethi, High performance mass spectrometry: chemical applications, *A.C.S. Symp. Ser. No. 70*, (Edited by M. L. Gross) American Chemical Society, Washington, (1978).
- <sup>2</sup>K. Biemann, *Pure Appl. Chem.* **50**, 149 (1978); <sup>b</sup>D. H. Williams, *Ibid.* **50**, 219 (1978).
- <sup>3</sup>P. Arpino et F. W. McLafferty, In F. C. Nachod, J. J. Zuckerman et E. W. Randall, *Determination of Organic Structures by Physical Methods*, Vol. 6. Academic Press, New York (1976).
- <sup>4</sup>D. F. Hunt et S. K. Sethi, *A.C.S. Symp. Ser. No. 70*, 150 (1978).
- <sup>5</sup>R. C. Dougherty, J. D. Roberts, W. Binkley, O. S. Chizhov, V. C. Kadentsev, et A. A. Solov'yov, *J. Org. Chem.* **39**, 451 (1974).
- <sup>6</sup>G. D. Daves, *Acc. Chem. Res.* **12**, 359, (1979).
- <sup>7</sup>H. R. Schulten, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **32**, 97, (1979).
- <sup>8</sup>P. Arpino et G. Devant, *Analysis*, **7**, 348 (1979).
- <sup>9</sup>D. J. Surman et J. C. Vickerman, *J. C. S. Chem. Commun.* 324, (1981); <sup>b</sup>M. Barber, R. S. Bordoli, R. O. Sedwick et A. N. Tyler, *J. C. S. Chem. Commun.* 325 (1981).
- <sup>10</sup>F. W. McLafferty, F. M. Bockhoff, *Anal. Chem.* **50**, 69, (1978); <sup>b</sup>F. W. McLafferty, *Acc. Chem. Res.* **13**, 33 (1980).
- <sup>11</sup>R. W. Kondrat et R. G. Cooks, *Anal. Chem.* **50**, 81A (1978); <sup>b</sup>J. G. Cooks, J. H. *Ibid.*, **51**, 437 (1974).
- <sup>12</sup>A. Maquestiau, Y. van Haverbeke, C. de Meyer, R. Flammang et J. Perlaux, *Bull. Soc. Chim. Belge* **85**, 69 (1976).
- <sup>13</sup>A. P. Bruins, K. R. Jennings et S. Evans, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **26**, 395 (1978).
- <sup>14</sup>R. K. Boyd, J. H. Beynon, *Org. Mass Spectrom.* **12**, 163 (1977).
- <sup>15</sup>A. E. Schoen, R. G. Cooks et J. L. Wiebers, *Science* **203**, 1249 (1979).
- <sup>16</sup>G. A. Warburton, R. McDowell, D. Hazelby, S. Evans et K. R. Compson, American Society for Mass Spectrometry, *27th Ann. Conf. on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Seattle, Washington, p. 133. (1979).
- <sup>17</sup>L. David, E. Scanzi, A. Kergomard, G. Kergomard, M. Duteurtre et T. Staron, *J. Antibiot.* **33**, 49 (1980).
- <sup>18</sup>T. Ast, M. H. Bozorgzadeh, J. L. Wiebers, J. H. Beynon et A. G. Brenton, *Org. Mass Spectrom.* **14**, 313 (1979); <sup>b</sup>B. Shushan et R. K. Boyd, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **34**, 37 (1980).