

Arch. Pharm. (Weinheim) 319, 1135–1138 (1986)

## Fluorimetrische und massenspektrometrische Untersuchung der Fluram®-Derivate von Aminoglykosid-Antibiotika

Maximilian Breiting<sup>a)+</sup>, Klaus K. Mayer<sup>b)</sup> und Wolfgang Wiegrebe<sup>b)+</sup>.

a) Fachbereich Pharmazie des Zentralen Instituts des Sanitätsdienstes der Bundeswehr, München

b) NWF IV – Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg, Postfach 397, D-8400 Regensburg  
Eingegangen am 9. Dezember 1985

Zwischen der Zahl der prim. Aminogruppen von Polyaminen und der Fluoreszenzintensität nach Umsetzung mit Fluram® besteht kein Zusammenhang. Die Produkte der Fluramumsetzung wurden ms untersucht (FD-MS, FAB-MS).

### Fluorimetric and Mass Spectrometric Investigation of the Fluram® Derivatives of Aminoglycoside Antibiotics

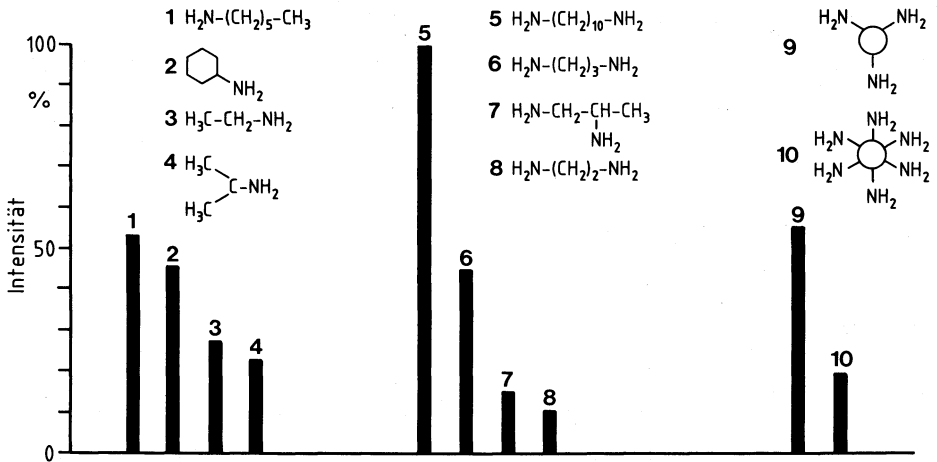
No simple correlation could be found between the number of primary amino groups of polyamines and the intensity of fluorescence after the reaction with Fluram®. The reaction products were identified by means of FD-MS and FAB-MS.

Die Umsetzung von Glykosidantibiotika mit prim. Aminofunktionen, z. B. Gentamicin, mit dem NH<sub>2</sub>-gruppenspezifischen Fluoreszenzreagens Fluram®-Roche<sup>1)</sup> wurde zu einer raschen densitometrischen Bestimmungsmethode für diese Wirkstoffklasse ausgearbeitet<sup>2)</sup>.

Ungeklärt sind bisher die Produkte der Umsetzung von Verbindungen mit mehreren Aminogruppen bei standardisiertem Verfahren. Wir haben daher die Mono- und Diamine **1–8** (Abb. 1) und die Antibiotika Netilmicin (**9**), Neomycin (**10**), Gentamicin C<sub>1</sub> (**11**), C<sub>1a</sub> (**12**) und C<sub>2</sub> (**13**) und Dibekacin (**14**) unter Standardbedingungen derivatisiert und die fluoreszierenden Reaktionsprodukte massenspektrometrisch im Felddesorptions (FD)<sup>3)</sup> – und Fast Atom Bombardment (FAB)<sup>4–6)</sup>-Verfahren untersucht.

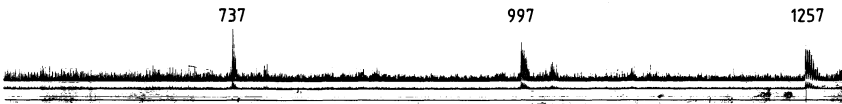
**1–8** wurden mit Fluram® umgesetzt und die hierbei auftretenden Fluoreszenzintensitäten in Lösungen gemessen (Abb. 1). Die Werte für 1,2-Diaminoethan (**8**), 1,2-Diaminopropan (**7**), 1,3-Diaminopropan (**6**) und 1,10-Diaminodecan (**5**) weisen darauf hin, daß die räumliche Nähe der Aminogruppen die Fluoreszenzintensität vermindert. Die Diamine **5** und **8** reagieren nach ms Untersuchungen (s. u.) zweifach mit Fluram®. Ein einfacher Zusammenhang zwischen der Struktur der überprüften Amine und der Fluoreszenzintensität ist nicht zu erkennen, auch bei den Aminoglykosid-Antibiotika Netilmicin (**9**) und Neomycin (**10**) mit drei bzw. sechs NH<sub>2</sub>-Gruppen ist keine Korrelation zwischen Fluoreszenzintensität und Zahl der Aminofunktionen feststellbar.

+) Aus der Dissertation *M. Breiting*, Regensburg 1985.



Ph 172.1

Abb. 1: Intensität der Fluoreszenz bei aliphatischen Mono- und Polyaminen. **9** = Netilmicin; **10** = Neomycin



Ph 172.2

Abb. 2: Pos. FAB-MS (Glycerin/HCl) des Gentamicin C<sub>1</sub>-Fluram®-Adduktes.

Die Reaktionsprodukte der Modellamine **3**, **5** und **8** ließen sich mittels FD-MS eindeutig identifizieren (Tab. 1). Bei den Diaminen **5** und **8** hatten beide NH<sub>2</sub>-Gruppen quantitativ mit Fluram® reagiert, bei Netilmicin (**9**) lagen die Produkte einfacher, doppelter und dreifacher Umsetzung nebeneinander vor. Die FD-MS lieferte bei den derivatisierten Aminoglykosiden **9**–**12** nur schwer reproduzierbare Spektren. Wir untersuchten ihre Fluram®-Derivate daher mit der FAB-MS in Glycerin/HCl als Matrix. Die Methode gab gut reproduzierbare Spektren (positive Ionen, Massenbereich bis  $m/z = 1800$ ) (Tab. 2 und Abb. 2).

Unter Standardbedingungen (s. Exp. Teil) reagieren nur Netilmicin (**9**) und Gentamicin C<sub>1</sub> (**11**) zum maximal möglichen Fluram®-Derivat, daneben treten stets die Produkte nur einfacher und zweifacher Umsetzung auf.

## Experimenteller Teil

FD- und FAB-MS; MAT 311A (Massenbereich 1200 bei 3 kV) mit kombinierter EI/FI/FD- bzw. EI/FAB-Quelle. FD: Emittier-Strom 15–20 mA; Emittier-Spannung 5–6 kV; Eintauchverfahren (Aceton/Wasser = 1:1). FAB: 11 NF Ion Tech. Ltd. saddle field ion gun (0.9 mA, 7.6 kV); Xe (99.99 %). 1–2 µg Substanz wurden in 1 µl Glycerin/HCl 10 % (v/v = 20:1) gelöst und auf ein Cu-Target aufgebracht.

Tab. 1: Ergebnisse der FD-Messungen

Amin	NH <sub>2</sub> -Gr.	Signale bei m/z	Umsetzung	Amin	NH <sub>2</sub> -Gr.	Signale bei m/z	Umsetzung
Ethylamin (3)	1	305	1 × -H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> N-(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -NH <sub>2</sub> (5)	2	692	2 × -2H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> (8)	2	580	2 × -2H <sub>2</sub> O	Netilmicin (9)	3	735	1 × -H <sub>2</sub> O
						995	2 × -2H <sub>2</sub> O
						1255	3 × -3H <sub>2</sub> O

Tab. 2: Ergebnisse der pos. FAB-Messungen

Amin	M	NH <sub>2</sub> -Gruppen	Signale bei m/z	Umsetzung	Amin	M	NH <sub>2</sub> -Gruppen	Signale bei m/z	Umsetzung
Netilmicin (9)	475	3	735	1 × -H <sub>2</sub> O	Gentamicin C <sub>1a</sub> (12)	449	4	709	1 × -H <sub>2</sub> O
			995	2 × -2H <sub>2</sub> O				969	2 × -2H <sub>2</sub> O
			1013	2 × -H <sub>2</sub> O				987	2 × -H <sub>2</sub> O
			1255	3 × -3H <sub>2</sub> O					
Neomycin (10)	614	6	874	1 × -H <sub>2</sub> O	Gentamicin C <sub>2</sub> (13)	463	4	723	1 × -H <sub>2</sub> O
			1135	2 × -2H <sub>2</sub> O + H <sup>⊕</sup>				983	2 × -2H <sub>2</sub> O
								1001	2 × -H <sub>2</sub> O
								1243	3 × -3H <sub>2</sub> O
Gentamicin C <sub>1</sub> (11)	477	3	737	1 × -H <sub>2</sub> O	Dibekacin (14)	451	4	711	1 × -H <sub>2</sub> O
			997	2 × -2H <sub>2</sub> O				971	2 × -2H <sub>2</sub> O
			1257	3 × -3H <sub>2</sub> O					

### Herstellung der Aminoglykosidantibiotika-Fluram®-Derivate für die FAB-MS

Prinzip: Lösungen der entspr. Sulfate in Wasser werden auf den optimalen pH-Wert eingestellt und mit Fluram® in Acetonitril in 200 µl-Anteilen unter Rühren versetzt.

a) *Gentamicine* C<sub>1a</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: 20 mg Gentamicin C<sub>1a</sub>-Sulfat in 1.0 ml Wasser wurden mit 0.2 N-NaOH auf pH 8 eingestellt und mit 35 mg Fluram® in 1.5 ml Acetonitril versetzt. Das gelbe Derivat wurde durch Zugabe von 2–3 ml Methanol in Lösung gehalten, hydrolysiertes Fluram wurde abfiltriert, das Filtrat i. Vak. für die FAB-Messung zur Trockne eingeengt.

Analog wurden umgesetzt: 6.5 mg Gentamicin C<sub>1</sub>-Sulfat in 0.5 ml Wasser mit 8.0 mg Fluram® in 0.5 ml Acetonitril. – 12.4 mg Gentamicin C<sub>2</sub>-Sulfat in 0.5 ml Wasser mit 20.8 mg Fluram® in 1.0 ml Acetonitril.

b) *Netilmicin*: 7.2 mg Sulfat in 0.5 ml Wasser, pH 8, 8.0 mg Fluram® in 0.5 ml Acetonitril. Analoge Ansätze bei pH 5.0 und 7.0. Aufarbeitung s. a) Bei umgekehrter Zugabe sind die FAB-Spektren schwer interpretierbar.

c) *Dibekacin*: 20 mg Sulfat in 0.5 ml Wasser, pH 9, 34.3 mg Fluram® in 1.5 ml Acetonitril. Aufarbeitung s. a.).

d) *Neomycin*: 90.8 mg Sulfat in 1.0 ml Wasser, pH 9, 160 mg Fluram® in 1.5 ml Acetonitril. Aufarbeitung s. a.).

### Bestimmung der relat. Fluoreszenzintensitäten von Diaminen

100 µl Stammlösung der jeweiligen Diamine (10<sup>-3</sup> mol in MeOH/Wasser 1:1-vol) wurden mit 3.0 ml Pufferlösung pH 8 (Merck 9888) und 0.5 ml Fluramlösung (3.0 mg in 10 ml absol. Aceton) 5 min geschüttelt (Mini Shaker, Fa. Braun, 500 U/min) und fluorimetriert. – Fluorimeter Perkin-Elmer MPF 2A, Hitachi Recorder; Spaltbreiten Emissions- und Anregungsmaximum je 4 nm; Dunkelstrom: 4; Empfindlichkeit: 4–6; Filter: 430 nm; Papiergeschwindigkeit: langsam. – Ergebnisse: Abb. 1.

Für FD-MS wurden die nach o. a. Angaben hergestellten Fluram-Derivate von Ethylamin, 1,2-Diaminoethan und 1,10-Diaminodecan durch Einengen i. Vak. gewonnen.

### Literatur

- 1 Fluram®-Roche, Firmenprospekt der Hoffmann-La Roche AG; Diagnostica, 7889 Grenzach-Wyhlen.
- 2 M. Breitinger, H. Paulus und W. Wiegrebe, Dtsch. Apoth. Ztg. 120, 1699 (1980).
- 3 H. D. Beckey und H. R. Schulten, Angew. Chemie 87, 425 (1975).
- 4 F. W. Röttgen, Nachr. Chem. Tech. Lab. 31, 174 (1983).
- 5 V. N. Reinhold und S. A. Carr, Mass Spectrom. Rev. 2, 153 (1983).
- 6 I. W. Gower, Biomed. Mass Spectrom. 12, 191 (1985).