

HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE NÁMELOVÝCH ALKALOIDŮ

PETR HALADA^a, ALEXANDR JEGOROV^b,
MIROSLAV RYSKA^c a VLADIMÍR HAVLÍČEK^a

^aMikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, ^bGalena s. s., Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, ^cVysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6

Došlo dne 18.VIII.1997

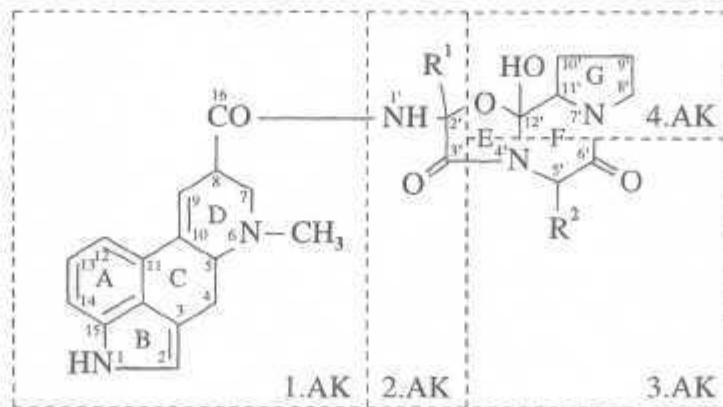
Obsah

1. Úvod
2. Klavinové námelové alkaloidy
 - 2.1. 9-Ergoleny
 - 2.2. 8-Ergoleny
 - 2.3. Ergoliny
 - 2.4. Seko-ergoliny
 - 2.5. Glykosidy námelových alkaloidů
3. Peptidové námelové alkaloidy
 - 3.1. Fragmentační schéma ergopeptinů
 - 3.2. Laktamové námelové alkaloidy
 - 3.3. Odlišení izobarických aminokyselin pomocí spekter získaných elektronovou ionizací
 - 3.4. Využití jiných ionizačních metod
4. Kvantitativní analýza

1. Úvod

Námelové alkaloidy představují skupinu přírodních látek se širokým spektrem biologických aktivit podmíněných interakcí s různými typy neuroreceptorů¹. Deriváty těchto látek proto nalézají široké uplatnění v klinické medicíně, především v neuroendokrinologii a při léčbě chorob souvisejících s poruchami nervového přenosu jak na úrovni centrální, tak periferní nervové soustavy, např. migrény, Parkinsonovy choroby nebo komplexu stařeckých chorob^{2,3}. Nejznámějším producentem námelových alkaloidů je tvrdohouba *Claviceps purpurea* (Fr.) Tul. parazitující převážně na žitu, podle níž je tato skupina alkaloidů pojmenována⁴. Námelové alkaloidy jsou však produkovány i celou řadou dalších hub, např. rodu *Balansia*⁵; *Sphacelia*⁶, *Penicillium*^{7,8}, *Acromonium*^{9,10}, *Aspergillus*^{11,12}, a byly nalezeny i ve vyšších rostlinách^{13,14}. Značný počet různých produkčních organismů spolu s nízkou specifitou některých enzymů podílejících se na syntéze alkaloidů přispívají k existenci řady strukturálně odlišných alkaloidů, jejichž počet každým rokem dále narůstá^{15,16}.

Vedle NMR spektroskopie a RTG difrakce při určování struktur námelových alkaloidů výrazně uplatňuje hmotnostní spektrometrie. Mezi její přednosti patří vysoká rychlost, nízká mez detekce a v neposlední řadě pak při použití kombinovaných technik (GC/MS, LC/MS, MS/MS) schopnost řešit struktury látek v komplikovaných směsích. Pro řešení struktur většiny námelových alkaloidů se jako



Obr. 1. Struktura peptidových námelových alkaloidů s označením pozic jednotlivých aminokyselin

nejvhodnější ukazuje elektronová ionizace (EI), při které ionty vznikají v důsledku interakce ionizujících primárních elektronů s molekulami vzorku v plynném stavu. Na fragmentační chování námellových alkaloidů za EI podmínky má vliv především struktura kruhu D a charakter substituce na C-8. Popisu fragmentačních mechanismů námellových alkaloidů a zhodnocení příspěvků jednotlivých ionizačních metod v dosavadní analýze této biologicky významné skupiny látek je věnována tato práce. Vzhledem k vysokému počtu dosud známých námellových alkaloidů a diverzitě jejich struktur se tento přehled soustřeďuje na alkaloidy s tetracyklickým ergolinovým skeletem: klaviny¹⁷, glykosidy námellových alkaloidů¹⁸, peptidové (obr. 1) a laktamové alkaloidy.

2. Klavinové námellové alkaloidy

Klavinové námellové alkaloidy obsahují kompletní čtyřkruhový ABCD systém. Podle charakteru a stupně nasycení D-kruhu je lze dále rozdělit na několik podskupin: ergoliny s nasyceným D-kruhem, 8-ergoliny ($\Delta^{8,9}$) a 9-ergoliny (A^9-10). Otevřeným D-kruhovým systémem v pozicích 6,7 se vyznačují seko-ergoliny. Další skupinu přírodních derivátů klavinových alkaloidů tvoří jejich glykosidy. Z rámce uvedených řad svou strukturou vybočují některé ojedinělé námellové alkaloidy, např. rugulovasiny, cykloklavin nebo klavicipitová kyselina, které poskytují odlišnou fragmentaci a nejsou v této práci podrobně uváděny.

2.1. 9-Ergoleny

Spektra 9-ergolenů mají intenzivní pík molekulárního iontu M^+ . Hlavním fragmentačním procesem je eliminace¹⁹ substituentu z C-8 poskytující ion m/z 223 (obr. 2), který charakterizuje kompletní tetracyklický systém. Následnou ztrátou jednoho resp. dvou atomů vodíku vznikají ionty m/z 222 a m/z 221. Původ iontu m/z 192 je vysvětlován²⁰ eliminací molekuly $CH_2 = NH$ z m/z 221. Odštěpením methylu z m/z 222 vzniká konjugovaný systém (m/z 207) mající vysokou četnost především u amidů kyseliny lysergové. Alternativním fragmentačním mechanismem iontu m/z 223 je štěpení piperidinového kruhu poskytující ion m/z 181, který ztrátou vinylu dále fragmentuje na m/z 154. Uvolněním molekuly kyanovodíku z m/z 154 vzniká ion m/z 127. Ztráta molekuly $CH_2 = CHR$ přímo z M^+ vede ke vzniku iontu m/z 196, který následnou eliminací methyleniminu poskytuje ion m/z 167. Charakteristické

iontové druhy m/z 167 a m/z 154, odpovídající plně konjugovanému ABC systému, jsou společné pro všechny námellové alkaloidy²¹.

2.2. 8-Ergoleny

Látky tohoto typu fragmentují při elektronové ionizaci méně ochotně a iontové druhy uvedené pro 9-ergoliny se u nich vyskytují s menší četností. V jejich spektrech se navíc neobjevují ionty m/z 181 a m/z 192. Přítomen je však velmi intenzivní pík iontu $[M-H]^+$, který bývá často pikem základním. Jeho stabilita je vysvětlována eliminací vodíku z C-10 poskytující konjugovaný systém²¹.

2.3. Ergoliny

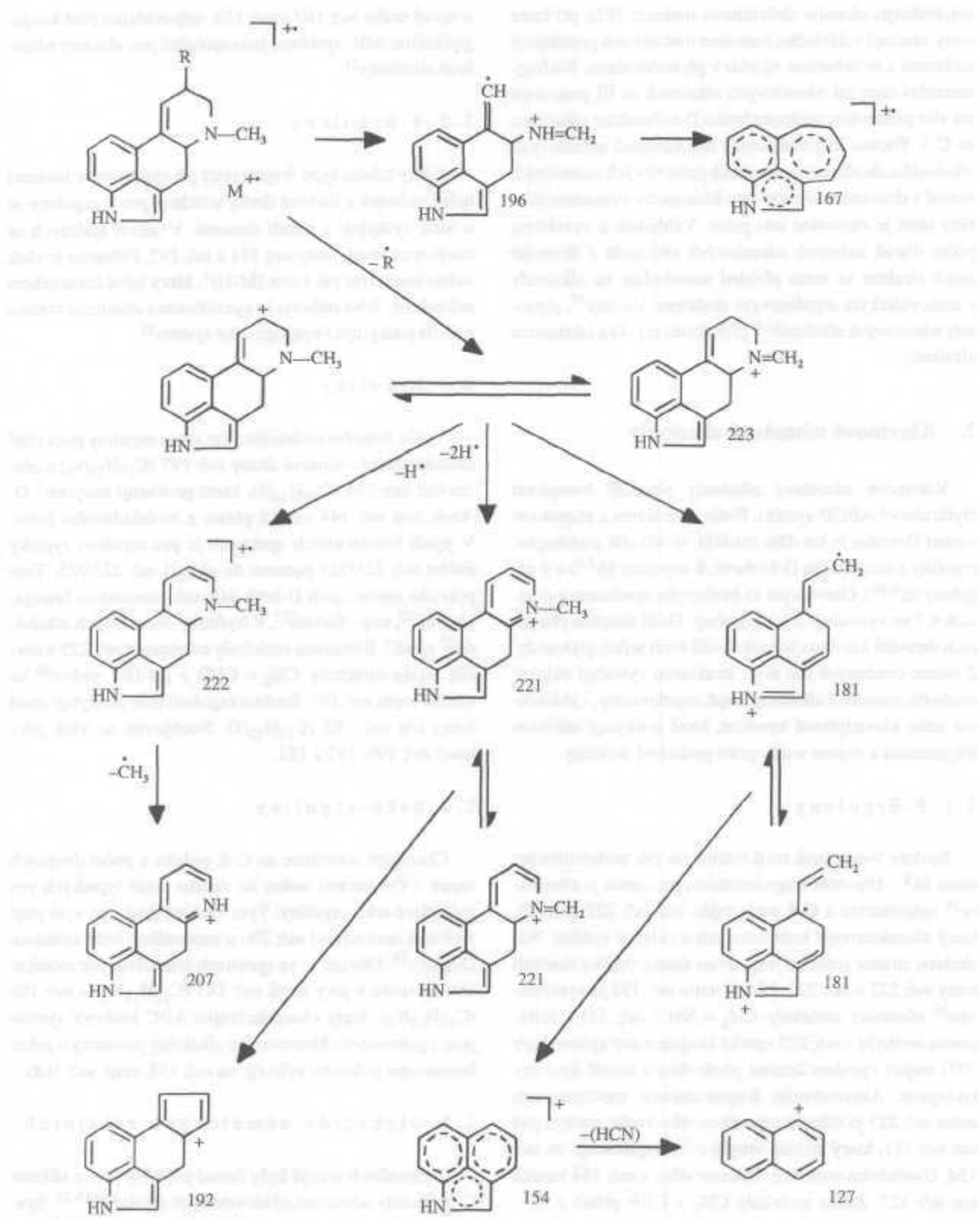
Vedle četného molekulárního iontu ergoliny poskytují charakteristické iontové druhy m/z 197 ($C_{13}H_{13}N_2$) a především m/z 144 ($C_{10}H_{10}N$), které prokazují nasycený D-kruh. Ion m/z 144 vzniká přímo z molekulárního iontu. V jejich hmotnostních spektrech je pro ergoliny typický dublet m/z 221/223 posunut do oblasti m/z 223/225. Toto pravidlo neplatí, je-li D-kruh dále substituován (u fumigaklavinů²², roquefortinů²², 8-hydroxy-námellových alkaloidů²³ apod.). Eliminace molekuly ethylenu z m/z 225 a rovněž ztráta molekuly $CH_2 = CHR$ z $[M-H]^+$ vedou²⁰ ke vzniku iontu m/z 197. Spektra ergolinů dále poskytují dosti četný ion m/z 182 ($C_{13}H_{12}N$). Neobjevují se však píky iontů m/z 196, 192 a 181.

2.4. Seko-ergoliny

Charakter substituce na C-8, poloha a počet dvojných vazeb v D-systému vedou ke vzniku iontů typických pro jednotlivé seko-ergoliny. Tyto iontové druhy se vyskytují v oblasti spektra nad m/z 200 a napomáhají řešit strukturu D-kruhu²⁴. Obecně je ve spektrech intenzivní pík molekulárního iontu a píky iontů m/z 183 ($C_{12}H_{11}N_2$) a m/z 196 ($C_{13}H_{12}N_2$). Ionty charakterizující ABC kruhový systém jsou v porovnání s klavinovými alkaloidy posunuty o jednu hmotnostní jednotku výše (tj. na m/z 155, resp. m/z 168).

2.5. Glykosidy námellových alkaloidů

Z přírodních zdrojů byly dosud popsány pouze některé O-glykosidy odvozené od klavinových alkaloidů²⁵⁻²⁸. Synteticky byly kromě řady dalších O-glykosidů^{26,29-32} připraveny rovněž i některé N-glykosylované alkaloidy^{33,34}.



Obr. 2. Dominantní fragmenční mechanismy 9-ergolenů za podmínek elektronové ionizace

Zatímco měření oligoglykosidů vyžaduje použití tzv. měkkých ionizačních metod jako jsou desorpce a ionizace laserem za pomoci matrice (MALDI) nebo ionizace rychlými atomy (FAB), EI byla využita při strukturní analýze monoglykosidů námelových alkaloidů²⁹. Ve spektrech je dominantní pík molekulárního iontu a jsou přítomny fragmenty vznikající štěpením sacharidové části s retencí náboje na aglykonu. Ionty patřící aglykonu samotnému mají minoritní zastoupení, a proto lze strukturu erginové části řešit jen částečně. V CI spektrech monoglykosidů³¹ dominuje pík protonované molekuly $[M+H]^+$. Ionty patřící sacharidu mají opět nízkou četnost a informace o jeho typu tedy poskytuje pouze rozdíl v m/z iontů $[M+H]^+$ a aglykonu³³. FAB ionizace v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií umožňuje charakterizovat rovněž termolabilní vyšší glykosidy včetně určení jejich sekvence³³. Tato technika byla například použita k analýze směsí vznikajících biotransformacemi různých námelových alkaloidů, které obsahovaly aglykon, volný cukr, mono- a oligoglykosidy^{25,35}.

3. Peptidové námelové alkaloidy

Peptidové námelové alkaloidy (ergopeptiny) jsou z biosyntetického hlediska tetrapeptidy tvořené jednou terciární β -aminokyselinou - kyselinou lysergovou (případně 9,10-dihydrolysergovou³⁶ nebo 8-hydroxy-lysergovou³⁷) a třemi α -aminokyselinami tvořícími tzv. cyklol. Biosyntéza ergopeptinů probíhá extraribozomálně pomocí multienzymatického komplexu. Tento typ biosyntézy má podstatně nižší specifitu než ribosomální syntéza, a proto může vzniknout celá řada příbuzných alkaloidů. Ve druhé poloze tetrapeptidu byly dosud nalezeny L-aminokyseliny Ala, Abu, Val a Ile, ve třetí poloze pak Abu, Val, Met, Leu, Ile, homo-Leu, homo-Ile, Phe. Čtvrtou aminokyselinou je ve většině alkaloidů L-prolin, v případě ergobalansinu pak L-alanin. Původní lineární tetrapeptid je v průběhu biosyntézy dále modifikován a postupně ztrácí typické vlastnosti lineárního peptidu. Acylace třetí aminokyseliny terminální karboxyskupinou za vzniku diketopiperazinového cyklu poskytuje intermediát, který je náchylný k racemizaci L-prolinu na D-prolin. Pokud k racemizaci nedojde, následně dochází k hydroxylaci α -uhlíku druhé aminokyseliny a vzniku cyklolu tvořenému třemi původními α -aminokyselinami, který je navázaný na kyselinu lysergovou jedinou, dosud nemodifikovanou peptidovou vazbou (obr. 1). Tyto alkaloidy jsou majoritním produktem biosyntézy. Alka-

loidy obsahující D-prolin a otevřený E-kruh mezi atomy C-2', C-12' se dalšího biosyntetického kroku neúčastní, hromadí se jako minoritní inaktivní produkty a jsou označovány jako laktamové námelové alkaloidy.

Ve spektrech peptidů mají obecně klíčový diagnostický význam imoniové a acylové ionty, které se podle hmotnostně spektrometrického názvosloví³⁸ označují jako ionty typu a^1 resp. b^1 (index označuje pozici dané aminokyseliny v peptidu). V případě peptidových námelových alkaloidů je třeba mít na zřeteli fakt, že vlivem následných modifikací původního lineárního peptidu a také podle typu dané aminokyseliny, neposkytují všechny zastoupené aminokyseliny oba typy iontů. Například první, třetí a čtvrtá aminokyselina je v EI spektrech zastoupena imoniovými ionty (m/z 223, $R^2-CH = NH_2^+$, m/z 70), druhá aminokyselina pak acylovým iontem R^1-CO^+ (viz dále).

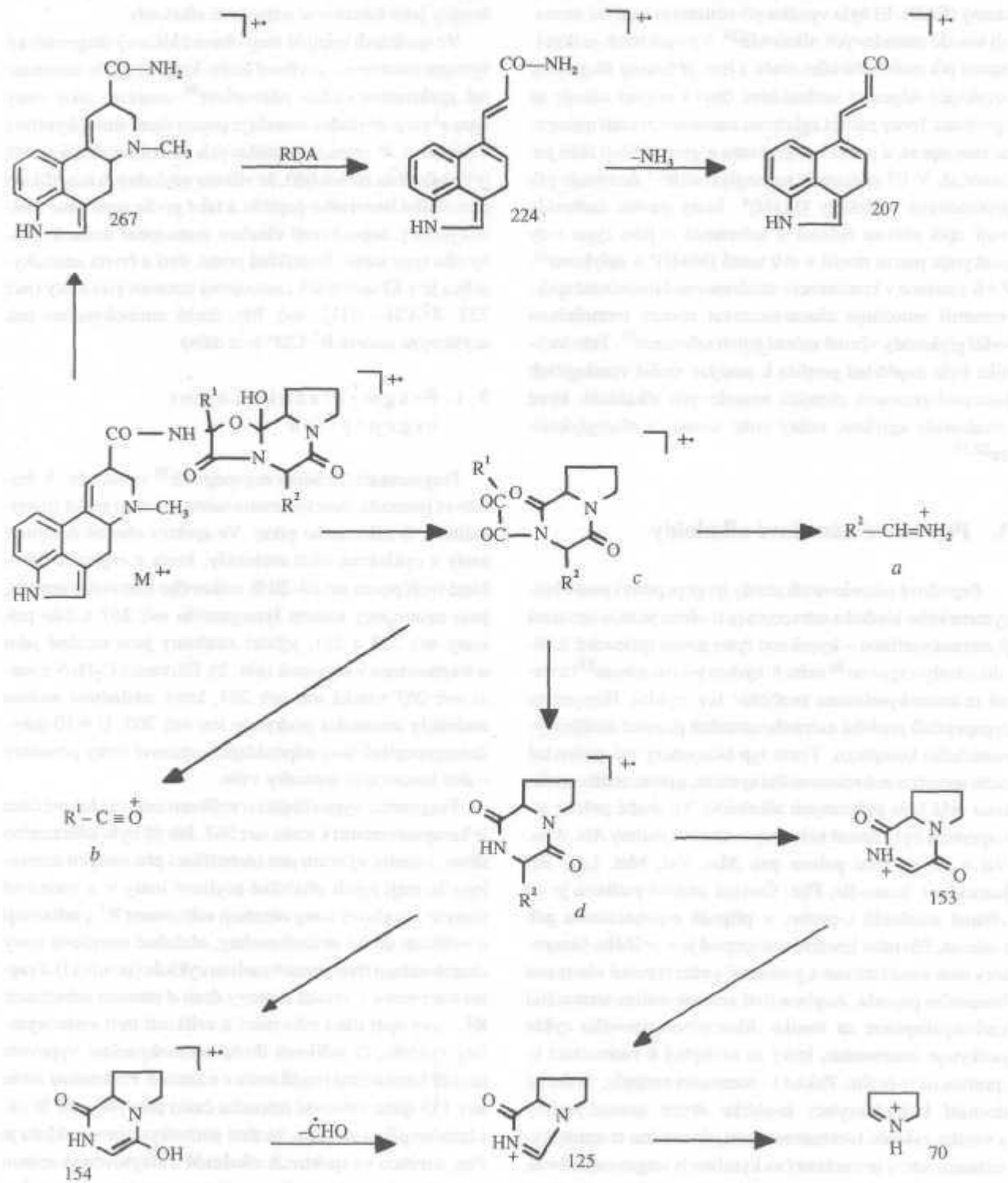
3.1. Fragmentační schéma ergopeptinů

Fragmentační schéma ergopeptinů³⁹ uvádí obr. 3. Relativní intenzita molekulárního iontu je velmi nízká (maximálně 1 % základního píku). Ve spektru obecně dominují ionty z cyklolové části molekuly. Ionty z erginové části, které tvoří pouze asi 10-20 % celkového iontového proudu, jsou zastoupeny iontem lysergamidu m/z 261 a dále pak ionty m/z 223 a 221, jejichž struktury jsou totožné jako u fragmentace 9-ergolenů (obr. 2). Eliminací C_2H_5N z iontu m/z 267 vzniká ion m/z 224, který následnou ztrátou molekuly amoniaku poskytuje ion m/z 207. U 9,10-dihydroergopeptinů jsou odpovídající erginové ionty posunuty o dvě hmotnostní jednotky výše.

Fragment c vypovídající o velikosti celé cyklolové části je komplementární k iontu m/z 267. Jak již bylo zdůrazněno dříve, zásadní význam pro identifikaci přítomných aminokyselin mají jejich příslušné acylové ionty b^1 a imoniové ionty a^1 . Acylové ionty obsahují substituent R^1 a informují o velikosti druhé aminokyseliny, obdobně imoniové ionty charakterizují třetí aminokyselinu cyklolu (tabulka I). Fragmentací iontu c vzniká iontový druh d nesoucí substituent R^2 , který opět dává informaci o velikosti třetí aminokyseliny cyklolu. O velikosti druhé aminokyseliny vypovídá rovněž hmotnostní rozdíl iontu c a iontu d . Přítomnost iontu m/z 153 (jeho relativní intenzita často převyšuje 50 % základního píku) ukazuje, že třetí aminokyselinou cyklolu je Phe, zatímco ve spektrech alkaloidů s alkylovou skupinou na C-5' je intenzivní pík m/z 154 (neztotožňovat s izobarickým erginovým iontem elementárního složení $C_{11}H_8N$).

Ztrátou molekuly oxidu uhelnatého z iontu m/z 153 nebo radikálu $\cdot\text{CHO}$ z iontu m/z 154 vzniká fragment m/z 125. Z něj pak následnou eliminací molekul CO a HCN vzniká

ion m/z 70, který je u téměř všech ergopeptinů nejčtenější. Analogickým iontem k m/z 125 je v případě semisyntetických 6'-deoxo-ergopeptinů⁴⁰ iontový druh m/z 111.



Obr. 3. Charakteristické fragmentační procesy pozorovatelné v EI spektrech peptidových námelových alkaloidů

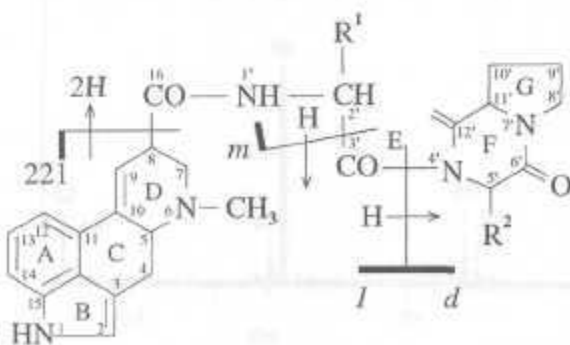
Tabulka I

Imoniové a acyliové ionty aminokyselin pozorovatelné ve spektrech dosud známých přírodních ergopeptinů

Aminokyselina	Ion <i>a</i> (<i>m/z</i>)	Ion <i>b</i> (<i>m/z</i>)
Ala	-	43
Abu	58	57
Pro	70	-
Val	72	71
Leu/Ile	86	85
homo-Ile	100	-
Met	104	-
Phe	120	-
Kys. lysergová	223	-
Kys. 8-hydroxy-lysergová	239	-
Kys. 9,10-dihydrolysergová	225	-

3.2. Laktamové námelové alkaloidy

Racemizace L-prolinu na D-prolinu v laktamových alkaloidů vede ke zcela jiné konformaci molekuly, která pravděpodobně brání následné hydroxylaci na druhé aminokyselině. Proto je molekulová hmotnost laktamových alkaloidů o 16 jednotek nižší a jejich fragmentace je poněkud odlišná od peptidových alkaloidů⁴¹. Poskytují sice známou sérii iontů z peptidové části *m/z* 154 nebo 153, 125 a 70, rovněž je přítomen ion *a*³. Ve spektru však chybí acyliový ion *b*² a ion *m/z* 267. Erginovou část zastupuje iontový druh *m/z* 221. U alkaloidů s alkylovou skupinou na C-5' chybí rovněž ion *d*, jen v případě Phe ve třetí poloze alkaloidu se ion *d* vyskytuje (*m/z* 244). Velikost druhé aminokyseliny umožňují určit charakteristické ionty *l* a *m* (obr. 4).



Obr. 4. Fragmentační mechanismus laktamových námelových alkaloidů

3.3. Odlišení izobarických aminokyselin pomocí spekter získaných elektronovou ionizací

Určit aminokyseliny přítomné ve struktuře cyklole umožňují tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS) v kombinaci s kolizně indukovanou disociací (CID) charakteristických iontů. K provedení MS/MS experimentu je třeba mít k dispozici systém alespoň dvou spřažených hmotnostních analyzátorů, např. sektorový přístroj s BE geometrií, kde je magnetický analyzátor předřazen elektrostatickému. Při klasickém uspořádání, kdy je aktivace vybraného iontu realizována v tzv. druhém prostoru bez pole (FFR 2), slouží první spektrometr k výběru žádaného iontového druhu. Druhým hmotnostním spektrometrem je pak analyzována směs iontů vzniklých jeho kolizně indukovanou disociací. Je-li kolizní aktivace prováděna v 1. prostoru bez pole (FFR 1), dochází k simultánní aktivaci všech iontů fokusovaných z iontového zdroje do kolizní cely. Produkty následně kolizně indukované disociace jsou pak zaznamenány spojeným B/E skenem. Rozvoj polí obou analyzátorů je volen tak, aby poměr intenzity elektrostatického pole *E* a magnetické indukce *B* byl konstantní a odpovídal rychlosti pohybu dceřiných iontů v_0 (obr. 5). Mateřské ionty se stejnou strukturou ale rozdílného původu poskytují téměř totožná dceřiná spektra, což umožňuje srovnávat spektra neznámých iontů se spektry standardů, a tak získávat informace o jejich struktuře.

Klíčovou roli v analýze aminokyselin přítomných v ergopeptinech hrají ionty *c*, *b*, *a* (obr. 3). Kolizní spektra iontu *c*, který zahrnuje celou peptidovou část alkaloidu, dávají informace o celkové velikosti substituentu R^1 i R^2 a upřesňují charakter větvení v bočním řetězci aminokyseliny ve třetí poloze alkaloidu⁴². Jednoznačně odlišovat izobarické aminokyseliny (tj. kyseliny o stejné hmotnosti), např. Leu a Ile, umožňují dceřiná spektra imoniových iontů *a*³ (obr. 6). V případě isoleucinu je v odpovídajícím kolizním spektru základním iontovým druhem *m/z* 69 vznikající eliminací amoniaku z mateřského iontu. Naopak u leucinu mohou být pozorovány typické iontové druhy *m/z* 30 ($\text{CH}_2 = \text{NH}_2^+$), *m/z* 43 (C_3H_7^+) a *m/z* 44, který vzniká ztrátou propenu z imoniového iontu.

Kolizní spektra acyliových iontů typu *b*² vypovídají pouze o velikosti druhé aminokyseliny cyklole⁴².

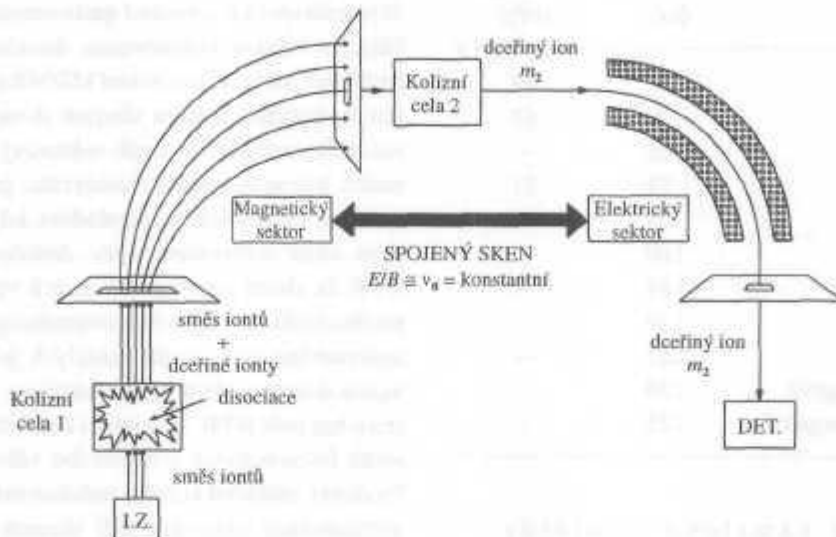
3.4. Využití jiných ionizačních metod

Ke studiu struktur peptidových námelových alkaloidů byly využity rovněž měkké ionizační metody jako jsou

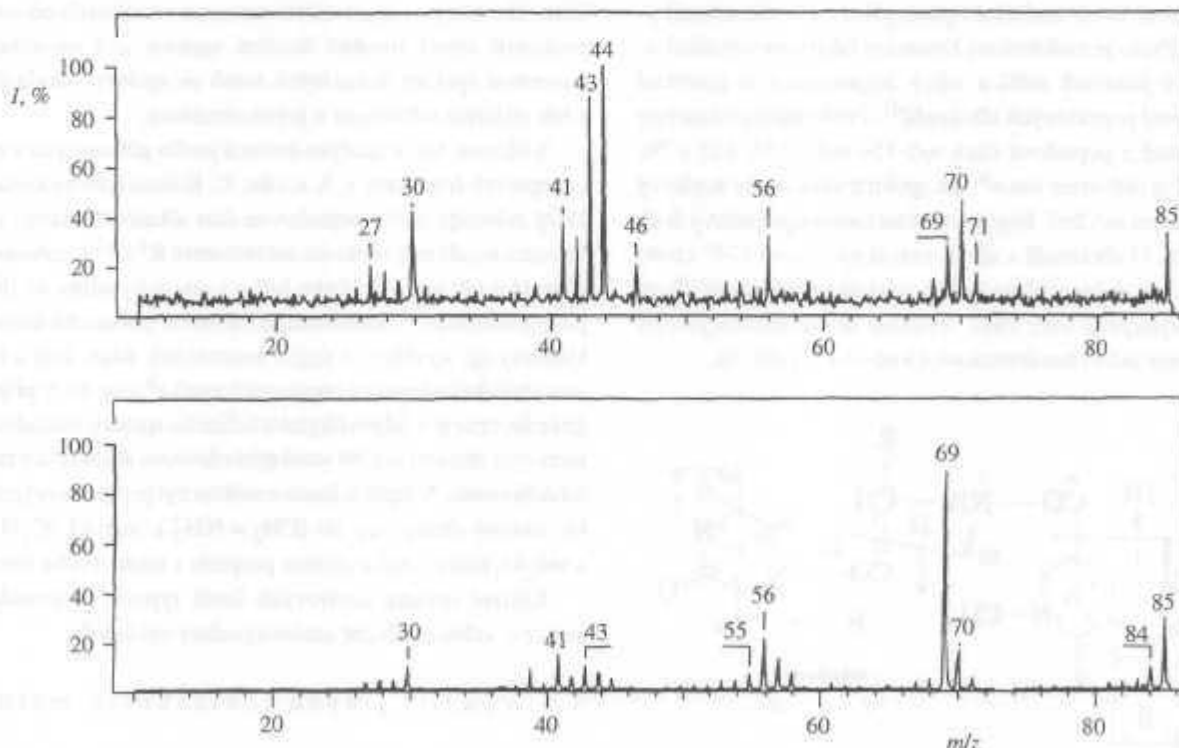
desorpce polem (FD), ionizace rychlými atomy (FAB) a chemická ionizace (CI), které však neposkytují tolik fragmentových iontů a ve srovnání s elektronovou ionizací se užívají především k jednoznačnému určení molekulové hmotnosti. FD spektra obsahují za podmínek optimální

teploty emitoru pouze intenzivní pík M^+ , při termálně indukované disociaci pak i píky iontů erginové (m/z 267) a peptidové části⁴³.

Při FAB ionizaci se snímáním pozitivních iontů dominuje ve spektrech pík protonované molekuly $[M+H]^+$



Obr. 5. Princip B/E spojeného skenu na sektorovém hmotnostním spektrometru s BE geometrií; I. Z. - iontový zdroj, DET. - detektor. Hodnota B nastavena tak, aby při konstantním poměru $B/E = v_0$ přístrojem procházel dceřiný ion m_2



Obr. 6. Kolizní spektra imoniového iontu m/z 86 α -ergokryptinu obsahujícího Leu, R^2 = iso-butyl (nahore) a P-ergokryptinu obsahujícího Ile, R^2 = sek-butyl (dole)

a dále je pozorována série iontů z erginové části m/z 223, 221, 196, 192, 181, 167, 154 a 127, která je analogická fragmentací za EI podmíněk⁴⁴.

Při použití chemické ionizace⁴⁵ jsou ve spektrech přítomny píky protonované molekuly $[M+H]^+$, fragmentů $[c+H]^+$, $[d+H]^+$ a dalších iontů z peptidové části m/z 154 a 70. Dominantní je pík iontu m/z 268 odpovídající protonovanému lysergamidu. U chemické ionizace negativních iontů byly podobně pozorovány iontové druhy $[M-H]^-$, $[d-H]^-$, m/z 266 a pík iontu "c" celé peptidové části, který je nejčetnější. Jeho dečinná spektra umožňují určovat velikost třetí aminokyseliny cyklotu⁴⁶ a rovněž i částečně charakterizovat typ větvení alkyly R².

4. Kvantitativní analýza

Hmotnostní spektrometrie v kombinaci s plynovou chromatografií (GC/MS), tenkovrstvou chromatografií (TLC/MS) nebo s kapalinovou chromatografií (HPLC/MS) nachází stále větší uplatnění při kvantitativní analýze námelových alkaloidů. Zatímco kombinaci GC/MS lze použít pouze pro klaviny a jednoduché deriváty kyseliny lysergové, spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie je možno analyzovat prakticky jakékoli námelové alkaloidy a jejich metabolity. V porovnání s dosud užívanými chromatografickými a imunologickými metodami vykazuje hmotnostní spektrometrie vyšší rychlost a selektivitu.

Aby se prokázalo zneužívání halucinogenů, bylo vyvinuto několik GC/MS metod stanovení diethylamidu kyseliny lysergové (LSD) a metabolitů v lidských tělních tekutinách⁴⁷. Pro zvýšení citlivosti se LSD a jeho metabolity převádějí na trimethylsilyl - (TMS) nebo trifluoracetyl - (TFA) deriváty. Meze detekce jsou u EI i CI řádově v desítkách pg/ml. Další zvýšení selektivity a možnost stanovit vybranou látku ve směsi dává spojení GC/MS/MS⁴⁸. Silylaci však nelze obecně doporučit jako vhodnou metodu pro kvantitativní analýzu vzhledem k nízké reaktivitě některých námelových alkaloidů⁴⁹.

Metod založených na měření pyrolytických produktů získaných termickým rozkladem ergopeptinů pomocí plynové chromatografie je možno použít v toxikologii⁵⁰ nebo farmakologii pro stanovení ergotaminu, dihydroergopeptinů⁵¹ nebo dalších semisyntetických námelových derivátů např. bromokryptinu nebo nicergolinu. Při GC/MS analýze ergotaminu s EI ionizací se meze detekce pohybují v řádu několika desítek pg/ml plazmy⁵². Kombinací MS/MS spektrometrie s chemickou ionizací se záznamem negativ-

ních iontů lze meze detekce pro ergotamin⁵³ a bromokryptin⁵⁴ snížit na jednotky pg/ml. Vzhledem k tomu, že podíl jednotlivých pyrolytických produktů značně závisí na použitých podmínkách (teplotě a době rozkladu) a řada produktů je společná pro více různých biologicky aktivních i neaktivních derivátů (např. pro ergopeptiny a jejich 8-epimery), jsou tyto metody postupně nahrazovány technikami HPLC/MS.

Vývoj v oblasti metod spojujících vysokoučinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickými technikami byl v minulosti podmíněn konstrukcí vhodného spojení mezi kapalinovým chromatografem a hmotnostním spektrometrem. Zavedení nových ionizačních metod jako jsou elektrosprej (ESI)⁵⁵⁻⁵⁷ a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)⁵⁸ umožnilo rutinně realizovat přímé spojení HPLC/MS v širokém rozsahu průtokových rychlostí mobilní fáze (2 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ až 2 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$). Další výhodou těchto technik je možnost provádět aktivaci iontů přímo v iontovém zdroji. Získaná kolizní spektra jednotlivých námelových alkaloidů postupně eluovaných z chromatografické kolony pak dávají další detailní strukturní informace o jednotlivých složkách směsi. HPLC/ESI-MS a HPLC/APCI-MS se tak výborně hodí k analýze nových (minoritních) alkaloidů v příslušných fermentačních tekutinách a především ke stanovení struktur metabolitů námelových alkaloidů. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s využitím termospreje pro ionizaci bylo např. použito pro studium metabolismu syntetického námelového derivátu CQA 206-291 (cit.⁵⁹).

Kromě kvalitativní analýzy je HPLC/MS používána i ke kvantifikaci. Například u nicergolinu byly použity kombinace HPLC/MS s ionizací za atmosférického tlaku (API)⁶⁰⁻⁶¹ nebo spojení chromatografie na tenké vrstvě s hmotnostní spektrometrií sekundárních iontů (TLC/SIMS)⁶². Při HPLC/API-MS jsou meze detekce řádově v jednotkách až desítkách ng/ml moči, resp. krve. U TLC/SIMS byly detekční meze určeny v řádu desítek ng/ml. Vedle sledování farmakokinetiky léčiv na bázi námelových alkaloidů a studia jejich metabolismu je dnes druhou nejvýznamnější oblastí potenciálního využití HPLC/MS analýza námelových alkaloidů v zemědělských produktech. Sledována je především koncentrace ergovalinu a některých dalších námelových alkaloidů v travách kontaminovaných některými endofytními houbami, jejichž zkrmování působí značné veterinární problémy⁶³⁻⁶⁵. V některých oblastech světa dosud zůstává stále aktuální i monitorování námelových alkaloidů v potravinách, mouce a hotových výrobcích⁶⁶.

Seznam akronymů převzatých
z anglosaské literatury

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
CID	Collisionally-Induced Dissociation
CI	Chemical Ionization
EI	Electron Ionization
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
FD	Field Desorption
FFR	Field Free Region
GC/MS	Gas Chromatography / Mass Spectrometry
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
LC/MS	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
LSD	Lysergic Acid Diethylamide
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
RDA	<i>retro</i> -Diels-Alder Reaction
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
TFA	Trifluoroacetyl-
TLC	Thin-Layer Chromatography
TMS	Trimethylsilyl-

LITERATURA

- Eich E., Pertz H.: *Pharmazie* 49, 867 (1994).
- Berde B., Schild H. O. (ed.): *Ergot Alkaloids and Related Compounds, Handbook of Experimental Pharmacology*, sv. 49. Springer-Verlag, Berlin 1978.
- Goldstein M., Calne D. B., Lieberman A., Thorner M. O. (ed.): *Ergot Compounds and Brain Function, Neuroendocrine and Neuropsychiatric Aspects, Advances in Biochemical Pharmacology*, sv. 23. Raven Press, New York 1980.
- Van Dongen P. W. J., De Groot A. N. J. A.: *Eur. J. Obstetr. Gyn.* 60, 109 (1995).
- Powell R., Plattner R. D., Yates S. G., Clay K., Leuchtman A.: *J. Nat. Prod.* 53, 1272 (1990).
- Atwell S. M., Mantle P. G.: *Experientia* 37, 1257 (1981).
- Scott P. M., Kennedy B. P. C.: *Agric. Food Chem.* 24, 865 (1976).
- Vining L. C., McInnes A. G., Smith D. G., Wright J. L. C., Taber W. A.: *FEMS Symp.* 23, 243 (1982).
- Garner G. B., Rottinghaus G. E., Cornell C. N., Te-stereci H.: *Agric. Ecosystems Environ.* 44, 65 (1993).
- Agee C. S., Hill N. S.: *Crop Sci.* 34, 221 (1994).
- Stauffacher D., Niklaus P., Tschertter H., Weber H. P., Hofmann A.: *Tetrahedron* 25, 5879 (1969).
- Moreau C.: *Cryptogam. Mycol.* 10, 33 (1989).
- Wilkinson R. E., Hardcastle W. S., McCormick C. S.: *J. Sci. Food Agric.* 39, 335 (1987).
- Costa C., Bertazzo A., Allegri G., Curcuruto O., Traldi P.: *J. Heterocyclic Chem.* 29, 1641 (1992).
- Cvak L., Jegorov A., Sedmera P., Havlíček V., Ondráček J., Hušák M., Pakhomova S., Kratochvíl B., Gran-zin J.: *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2 1994, 1861.
- Cvak L., Minář J., Pakhomova S., Ondráček J., Kra-tochvíl B., Sedmera P., Havlíček V., Jegorov A.: *Phy-tochemistry* 42, 231 (1996).
- Jacobs W. A., Gould R. G.: *J. Biol. Chem.* 120, 141 (1937).
- Ninomiya I., Kiguchi T., v knize: *Ergot Alkaloids* (Manske R. H. F., Holmes H. L., ed.), sv. 38, str. 142. Academic Press, New York 1990.
- Nigam I. C., Holmes J. L.: *J. Pharm. Sci.* 58, 506 (1968).
- Schmidt J., Kraft R., Voigt D.: *Biomed. Mass Spec-trom.* 5, 674(1978).
- Barber M., Weissbach A., Douglas B., Dudek G. O.: *Chem. Ind. (London)* 1965, 1072.
- Cole R. J., Cox R. H., v knize: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, str. 527. Academic Press, New York 1981.
- Cvak L., Jegorov A., Pakhomova S., Kratochvíl B., Sedmera P., Havlíček V., Minář J.: *Phytochemistry* 44, 365 (1997).
- Schmidt J., Maier W.: *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 290 (1984).
- Havlíček V., Flieger M., Křen V., Ryska M.: *Biol. Mass Spectrom.* 23, 57 (1994).
- Křen V., Sedmera P., Havlíček V., Fišerová A.: *Tet-rahedron Lett.* 33, 7233 (1992).
- Flieger M., Zelenková N. F., Sedmera P., Křen V., Novák J., Rylko V., Sajdl P., Řeháček Z.: *J. Nat. Prod.* 52, 506(1989).
- Floss H. G., Günther H., Mothes U., Becker I.: *Z. Naturforsch.* 22b, 399 (1966).
- Křen V., Svatoš A., Vaisar T., Havlíček V., Pažoutová S., Šaman D.: *J. Chem. Res. (S)*, 89, (1993).
- Křen V., Ščigelová M., Příkrylová V., Havlíček V., Sedmera P.: *Biocatalysis* 10, 181 (1994).
- Flieger M., Křen V., Zelenková N. F., Sedmera P., Novák J., Sajdl P.: *J. Nat. Prod.* 53, 171 (1990).

32. Ščigelová M., Křen V., Nilsson K. G. I.: *Biotechnol. Lett.* 16, 683 (1994).
33. Křen V., Olšovský P., Havlíček V., Sedmera P., Witvrouw M., de Clercq E.: *Tetrahedron* 53, 4503 (1997).
34. Křen V., Piskala J., Sedmera P., Havlíček V., Přikrylová V., Witvrouw M., de Clercq E.: *Nucleos. Nucleot.* 16, 97(1997).
35. Křen V., Augé C., Sedmera P., Havlíček V.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1994, 2481.
36. Mantle P. G.: *Ann. Appl. Biol.* 62, 443 (1968).
37. Pakhomova S., Ondráček J., Kratochvíl B., Jegorov A., Cvak L.: *Z. Kristallogr.* 211, 39 (1996).
38. Roepstorff P., Fohlman J.: *Biomed. Mass Spectrom.* 11, 601 (1984).
39. Vokoun J., Řeháček Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 40, 1731 (1974).
40. Sedmera P., Cvak L., Jegorov A., Havlíček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, připraveno do tisku.
41. Stuchlík J., Krajíček A., Cvak L., Spáčil J., Sedmera P., Flieger M., Vokoun J., Řeháček Z.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 47, 3312 (1982).
42. Halada P., Jegorov A., Cvak L., Sedmera P., Ryska M., Havlíček V.: *Eur. Mass Spectrom.*, zasláno do redakce.
43. Havlíček V., Ryska M.: *Sci. Papers Univ. Chem. Technol. Prague* 1, 50 (1993).
44. Casy A. F.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 41 (1994).
45. Porter J. K., Betowski D.: *J. Agric. Food Chem.* 29, 650(1981).
46. Plattner R. D., Yates S. G., Porter J. K.: *J. Agric. Food Chem.* 31, 785 (1983).
47. Nelson C. C., Foltz R. L.: *J. Chromatogr.* 580, 97 (1992).
48. Nelson C. C., Foltz R. L.: *Anal. Chem.* 64, 1578 (1992).
49. Křen V., Sedmera P., *Coll. Czech. Chem. Commun.* 61, 1248 (1996).
50. Uboh C. E., Rudy J. A., Railing F. A., Enright J. M., Shoemaker J. M., Kahler M. C., Schellenberger J. M., Kemescei Z., Das D. N., Soma L. R., Leonard J. M.: *J. Anal. Toxicol.* 19, 307 (1995).
51. Plomp T. A., Leferink J. G., Maes R. A. A.: *J. Chromatogr.* 757, 121 (1978).
52. Feng N., Minder E. I., Grampp T., Vonderschmitt D. J.: *J. Chromatogr.* 575, 289 (1992).
53. Häring N., Settlage J. A., Sanders S. W.: *Biomed. Mass Spectrom.* 12, 1997 (1985).
54. Häring N., Salama Z., Jaeger H.: *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 38, 1529(1988).
55. Alexandrov M. L., Gall L. N., Krasnov V. N., Nikolaev V. I., Pavlenko V. A., Shkurov V. A., Baram G. I., Gracher M. A., Knorre V. D., Kusner Y. S.: *Bioorg. Khim.* 10, 710(1984).
56. Yamashita M., Fenn J. B.: *J. Phys. Chem.* 88, 4451 (1984).
57. Alexandrov M. L., Gall L. N., Krasnov V. N., Nikolaev V. I., Pavlenko V. A., Shkurov V. A.: *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 227, 379 (1984).
58. French J. B., Reid N. M., v knize: *Dynamic Mass Spectrometry* (Price D., Todd J. F. J., ed.), sv. 6. Heyden and Son, London, 1994.
59. Ball S. E., Maurer G., Zollinger M., Ladona M., Vickers A. E. M.: *Drug Metab. Dispos.* 20, 56 (1992).
60. Banno K., Horimoto S.: *Chromatographia* 31, 50 (1991).
61. Banno K., Horimoto S., Mabuchi M.: *J. Chromatogr.* 568, 375 (1991).
62. Banno K., Matsuoka M., Takahashi R.: *Chromatographia* 52, 179(1991).
63. Peters C. W., Grigsby K. N., Aldrich C. G., Paterson J. A., Lipsey R. J., Kerley M. S., Garner G. B.: *J. Anim. Sci.* 70, 1550(1992).
64. Hill N. S., Rottinghaus G. E., Agee C. S., Schultz L. M.: *Crop Sci.* 33, 331 (1993).
65. Scott P. M., Lombaert G. A., Pellaers P., Bacler S., Lappi J.: *J. AOC Int.* 75, 773 (1992).
66. Shelby R. A., Flieger M.: *J. Agric. Food Chem.* 45, 1797 (1997).

P. Halada^a, A. Jegorov^b, M. Ryska^c, and V. Havlíček^a (^a*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*, ^b*Galena Co., České Budějovice*, ^c*Institute of Chemical Technology, Prague*): **Mass Spectrometry of Ergot Alkaloids**

Mass spectrometric methods used for the identification and analyses of ergot alkaloids are surveyed. Attention is paid to characteristic ions and fragmentation schemes for a given series of ergot alkaloids. The use of linked-scan techniques is demonstrated for the distinguishing of isobaric ergopeptines. The potential of the coupled HPLC/MS techniques for the analysis of complex ergot alkaloid mixtures and their metabolites is also briefly mentioned.