

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra analytické chemie**

---

# STANOVENÍ SIBIROMYCINU METODOU UPLC

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Školitel: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Školitel-garant: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Jany Olšovské, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. 4. 2010

.....

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a poskytnutí cenných rad a informací při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zdeňkovi Kameníkovi a Mgr. Tereze Tylové za přátelské přijetí, milý přístup a ochotu vždy pomoci. Velký dík patří především za příjemnou spolupráci Jürgenu Felsbergovi, Csc., Ing. Markétě Jelínkové, Csc. a Miriam Chudomelové, bez nichž by tato práce vůbec nevznikla. Dále také velmi děkuji za spolupráci RNDr. Miroslavu Šulcovi, Ph.D. a za poskytování cenných rad Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, Csc. Na závěr mé velké díky patří rodičům a mým nejbližším, kteří mě po celou dobu podporovali.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** sibiromycin, SPE, UPLC, MS

**PŘEDMĚTOVÁ HESLA:** izolace a stanovení sibiromycinu a jeho derivátů, srovnání  
produkce sibiromycinu na různých fermentačních médiích

## ABSTRAKT

Sibiromycin, antibiotikum strukturně patřící do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinů, je produkován aktinomycetou *Streptosporangium sibiricum*. Sibiromycin vykazuje antibakteriální a především protinádorové účinky, které však díky jeho prokázané kardiotoxicitě zatím nelze využít. Další výzkum možného terapeutického využití sibiromycinu se zabývá přípravou nových netoxických derivátů produkovaných geneticky manipulovanými kmeny *S. sibiricum*. Pro tyto účely byla vyvinuta a částečně validována nová rutinní chromatografická UPLC/UV a prekoncentrační metoda. Fermentační médium bylo extrahováno metodou extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction, SPE) na kolonkách OASIS MCX, založených na kationtové výměně. Získaný extrakt byl po odpaření a rozpuštění v methanolu dávkován na UPLC BEH C18 kolonu a chromatografován v gradientovém módu s mobilními fázemi methanol (A) a 0,1% kyselina trifluoroctová (B). Detekční limit metody byl 40 ng/ml fermentačního média, výtěžnost SPE metody byla 74,75 % a její reprodukovatelnost vyjádřená jako RSD byla 5,18 %. Metoda byla aplikována na sledování rozdílné produkce sibiromycinu kmenem *S. sibiricum* na 13 typech médií. Bylo zjištěno, že složení fermentačního média ovlivňuje nejen celkovou produkci sibiromycinu, ale také syntézu jeho přírodních derivátů, které byly na závěr práce také identifikovány za pomoci hmotnostní spektrometrie.

## ABSTRACT

Sibiromycin is produced by actinomycetes of *Streptosporangium sibiricum* and structurally belongs to family of pyrrolo-1,4-benzodiazepines. Sibiromycin is characterized by antibacterial and especially antitumor activity but due to its proved cardiotoxicity it cannot be used. The following research of possible therapeutic sibiromycin utilization is concerned on new nontoxic derivatives produced by genetic manipulated strains of *S. sibiricum*. For this purpose a new routine chromatographic UPLC-UV method with analyte preconcentration was developed and partially validated. A fermentation broth was extracted by solid phase extraction (SPE) on OASIS MCX columns with the sorbent based on a cation-exchange. Eluted extract was evaporated, reconstituted in methanol and loaded onto UPLC BEH C18 column and analyzed under gradient mode with mobile phases of methanol (A) and trifluoroacetic acid (B). Detection limit of the method was determined as 40 ng/ml, the recovery was 74.75 % and its reproducibility expressed as RSD was 5.18 %. The method was applied to comparison of sibiromycin production by *S. sibiricum* on 13 different fermentation media. It was found, that a composition of fermentation media influences not only the sibiromycin production but also a synthesis of sibiromycin nature derivatives, which were finally identified by mass spectrometry.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1	Sibiromycin, přírodní antibiotikum s protinádorovými účinky.....	11
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>12</b>
2.1	Produkce sibiromycinu a jeho biologická aktivita .....	12
2.2	Chemická struktura sibiromycinu.....	14
2.3	Použitá metodika .....	17
2.3.1	UPLC .....	17
2.3.2	SPE .....	20
<b>3</b>	<b>Experimentální část</b> .....	<b>22</b>
3.1	Chemikálie.....	22
3.2	Instrumentace.....	23
3.3	Příprava sibiromycinu .....	24
3.3.1	Kultivace <i>S. sibiricum</i> (Jürgen Felsberg, Csc., Ing. Markéta Jelínková, Csc.) .....	24
3.3.2	LLE.....	24
3.3.3	Preparativní HPLC .....	24
3.3.4	Hmotnostní spektrometrie (RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.) .....	25
3.4	Stanovení sibiromycinu .....	26
3.4.1	SPE .....	26
3.4.2	UPLC .....	26
3.5	Stanovení biologické aktivity sibiromycinu .....	27
<b>4</b>	<b>Výsledky a diskuze</b> .....	<b>28</b>
4.1	Optimalizace extrakčních metod .....	28
4.1.1	Vývoj LLE.....	28
4.1.2	Vývoj SPE .....	29
4.1.3	Srovnání SPE a LLE.....	31
4.2	Optimalizace chromatografických metod.....	33
4.2.1	Vývoj UPLC .....	33
4.2.2	Vývoj preparativní HPLC.....	37
4.3	Validace UPLC metody.....	38
4.3.1	Kalibrační křivka .....	38

4.3.2	Mez stanovitelnosti (LOQ), mez detekce (LOD) .....	38
4.3.3	Přesnost.....	39
4.3.4	Správnost .....	39
4.3.5	Výtěžnost .....	40
4.3.6	Stabilita.....	40
4.4	Produkce sibiromycinu na různých typech médií.....	41
4.5	Identifikace sibiromycinu a jeho derivátů na základě hmotnostní spektrometrie (RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.) .....	43
4.6	Stanovení biologické aktivity .....	47
<b>5</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>50</b>



# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

## Zkratky:

ACN	acetonitril
BEH	UPLC sorbent založený na ethylenových můstcích (Bridged Ethylene Hybrid)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
IČ	infračervené záření
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LLE	extrakce kapalina-kapalina (Liquid-Liquid Extraction)
LOD	mez detekce (Limit of Detection)
LOD <sub>M</sub>	mez detekce metody (Method Limit of Detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (Limit of Quantification)
LOQ <sub>M</sub>	mez stanovitelnosti metody (Method Limit of Quantification)
MCX	SPE sorbent založený na kationtové výměně (Mixed-mode Cation-eXchange)
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance (Nuclear Magnetic Resonance)
PBD	pyrrolo-1,4-benzodiazepiny (Pyrrolo-1,4-BenzoDiazepines)
PDA	detektor diodového pole (Photodiode Array Detector)
RSD	relativní směrodatná odchylka
SPE	extrakce na tuhé fázi (Solid Phase Extraction)
TFA	trifluoroctová kyselina (Trifluoroacetic Acid)
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (Ultra-Performance Liquid Chromatography)
UV/VIS	ultrafialové/viditelné záření (Ultraviolet/Visible)

## **Symbols:**

<i>Abs</i>	absorbance
<i>H</i>	výškový ekvivalent teoretického patra
<i>Mr</i>	relativní molekulová hmotnost
$\lambda$	vlnová délka
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj fragmentu
<i>R</i>	korelační koeficient
<i>t<sub>R</sub></i>	retenční čas
<i>u</i>	lineární průtoková rychlost
<i>v/v</i>	objemový podíl

# 1 ÚVOD

## 1.1 Sibiromycin, přírodní antibiotikum s protinádorovými účinky

Antibiotika se od objevu jejich prvního zástupce, penicilinu, v roce 1928 stala téměř nepostradatelnou součástí našich životů. V současnosti je popsáno více než 20 000 biologicky aktivních přírodních látek. Z tohoto množství se v praxi používá pouze 150-200 látek, což představuje jen malý zlomek nejen známých, ale i dosud neobjevených biologicky aktivních sloučenin. V humánní medicíně se používají jak antibiotika izolovaná z přirozených producentů, tak i jejich deriváty připravené buď částečnou nebo úplnou chemickou syntézou, které mají lepší antimikrobiální a farmakokinetické vlastnosti. Po 60 letech používání a často i zneužívání těchto látek však dramaticky stoupá rezistence bakterií k většině používaných antibiotik. Je proto nutné zaměřit se na výzkum dalších látek, které ještě své uplatnění nenašly, ale mohly by být značným přínosem.

Jednou z těchto látek je sibiromycin, produkovaný *Streptosprangium sibiricum*. Patří do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinových antibiotik (PBD), což je třída přírodních produktů produkovaných aktinomycetami s antibakteriálními, ale především protinádorovými účinky. Mechanismus účinku spočívá v sekvenčně selektivní vazbě antibiotika na deoxyribonukleovou kyselinu (DNA). Sibiromycin, jeden ze dvou dosud identifikovaných glykosylovaných PBD, má v této skupině antibiotik nejvyšší afinitu k DNA a potenciálně nejvyšší protinádorové účinky. Navzdory těmto slibným vlastnostem však klinické testy na myších prokázaly značný kardiotoxický vliv na pokusná zvířata, za který je zodpovědná hydroxylová skupina na C9 uhlíku. Metody kombinatorní biosyntézy by mohly pomoci vytvořit netoxické analogy sibiromycinu, což vyžaduje důkladnou znalost nejenom biosyntetické dráhy, ale i spolehlivé metody stanovení.

Cílem této diplomové práce bylo připravit primární standard sibiromycinu, který není komerčně dostupný, izolací z fermentačního média a dále vyvinout a validovat rutinní metody SPE přípravy vzorku s následným stanovením metodou UPLC s UV detekcí. Na závěr bylo třeba srovnat produkci sibiromycinu za různých kultivačních podmínek.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Produkce sibiromycinu a jeho biologická aktivita

Antibiotikum sibiromycin, jehož producentem je *Streptosporangium sibiricum*, patří do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinových antibiotik. Kromě sibiromycinu lze do této skupiny strukturně podobných látek zařadit další významné zástupce produkované různými aktinomycetami (Tab. 1).

**Tab. 1 Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny a jejich hlavní producenti**

Zástupce	Producent
sibiromycin <sup>1</sup>	<i>Streptosporangium sibiricum</i>
anthramycin <sup>2</sup>	<i>Streptomyces refuineus</i>
neothramycin <sup>3</sup>	<i>Streptomyces sp. MC916-C4</i>
mazethramycin <sup>4</sup>	<i>Streptomyces thioluteus</i>
porothramycin <sup>5</sup>	<i>Streptomyces albus</i>
tomaymycin <sup>6</sup>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
prothracarcin <sup>7</sup>	<i>Streptomyces umbrosus</i>
dextrochrysin <sup>8</sup>	<i>Streptomyces calvus</i>
chicamycin <sup>9</sup>	<i>Streptomyces albus</i>

Kmen *Streptosporangium sibiricum* byl poprvé izolován na Sibiři, odtud název *sibiricum*, a popsán v roce 1969 (Gause a kol.)<sup>1</sup>. Na základě morfologických a fyziologických znaků byl zařazen do rodu *Streptosporangium*. S vývojem taxonomických a molekulárních metod se však ukázalo, že toto zařazení je nepřesné. V roce 1996 Ward-Rainei a kol. uvedli, že na základě analýzy 16S rDNA by měl být kmen *S. sibiricum* zařazen spíše do rodu *Actinoplanaceae*.<sup>10</sup>

První antibiotikum produkované rodem *Streptosporangium* bylo objeveno v roce 1966 v Japonsku a nazváno sporaviridinový komplex.<sup>11</sup> Objev sibiromycinu následoval, jak již bylo napsáno, o tři roky později.<sup>1</sup> Rod *Streptosporangium* se v posledních desetiletích ukázal jako hodnotný zdroj užitečných metabolitů, zejména antibiotik, i když výsledné procento využití je mnohem nižší ve srovnání s jinými aktinomycetami (např. *Streptomyces*). Látky, jež *Streptosporangium* produkuje, jsou z hlediska chemické struktury velmi různorodé.<sup>12</sup>

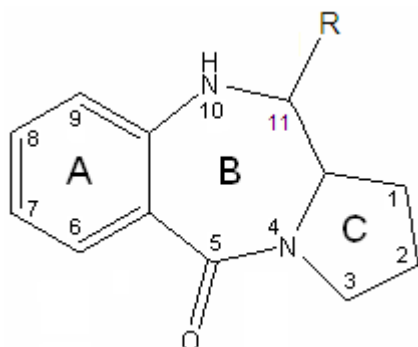
Z hlediska biologického vykazují sibiromycin i další pyrrolo-1,4-benzodiazepiny antibiotické a protinádorové účinky. Mechanismus jejich antibiotického působení je založen na tvorbě kovalentní vazby s guaninem v DNA, což inhibuje syntézu deoxyribonukleové kyseliny. Pro tuto vazbu je důležité asymetrické centrum na C11 uhlíku (Obr. 1), což předurčuje sloučenině pravotočivé vinutí, které usnadňuje vazbu v malém žlábků DNA.<sup>13,14</sup> Pyrrolo-1,4-benzodiazepiny mají značný význam jako transkripční inhibitory. V experimentální studii byly použity dvě metody *in vitro* transkripce a byla zkoumána efektivita inhibice vybranými PBD, přičemž sibiromycin působil v obou případech nejučinněji.<sup>15</sup>

Především přírodní pyrrolo-1,4-benzodiazepiny jsou díky tvorbě kovalentní vazby s DNA označovány jako látky s potenciálními protinádorovými účinky, přičemž vykazují minimální vliv na kostní dřeň. Pro zjištění, zda by mohl být sibiromycin využíván v medicíně, byly prováděny základní klinické studie na pokusných zvířatech. Byla testována protinádorová aktivita proti 6 různým nádorům na myších.<sup>16</sup> Některé nádory po několika dávkách sibiromycinu zcela zmizely. Dále byly testovány rozdíly působení v závislosti na způsobu podání a dávce a také vliv dávky na zhoršení funkce srdce, jater a ledvin.<sup>17</sup> Z důvodu zjištěné kardiotoxicity není sibiromycin klinicky využíván.

Existuje však potenciální možnost přípravy geneticky manipulovaných kmenů, které budou produkovat analogy sibiromycinu, v nichž bude tento toxický efekt eliminován. Proto je znalost biosyntetické dráhy sibiromycinu nezbytnou součástí dalších výzkumů. Při objasňování biosyntézy sibiromycinu vědci čerpali z navrhovaných nebo již objasněných biosyntetických drah strukturně podobných látek. Biosynteticky jsou pyrrolo-1,4-benzodiazepiny podobné linkomycinu, tudíž i vznik hydropryrolové části sibiromycinu z L-tyrosinu byl částečně identifikován pomocí biosyntetické dráhy linkomycinu<sup>18</sup>. Navrhnutá biosyntetická dráha pro antranilovou část molekuly vychází z L-tryptofanu kynureninovou cestou<sup>14,19,20,21</sup>, která tvoří základ biosyntézy i dalších pyrrol-1,4-benzodiazepinů, a to antramycinu a tomamycinu. Od osmdesátých let byly tyto biosyntetické cesty upřesňovány a byly objevovány nové strategie a postupy.<sup>22,23</sup> Detailněji byla celková biosyntetická dráha sibiromycinu studována v roce 2009 včetně biosyntézy jeho cukerné složky.<sup>24</sup>

## 2.2 Chemická struktura sibiromycinu

Z hlediska chemické struktury lze sibiromycin zařadit do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinových antibiotik (PBD). Základní struktura PBD (Obr. 1) je založena



na tricyklickém systému, který se skládá z kruhu aromatického A, pyrrolového C (s různým stupněm nenasycenosti) a struktury 1,4-diazepin-5-on B tvořící kruh prostřední.<sup>25</sup> Sibiromycin navíc obsahuje ve své struktuře cukernou složku (Obr. 2, Obr. 3). Číslování chemické struktury PBD bylo převzato z literárních zdrojů.<sup>26,27</sup>

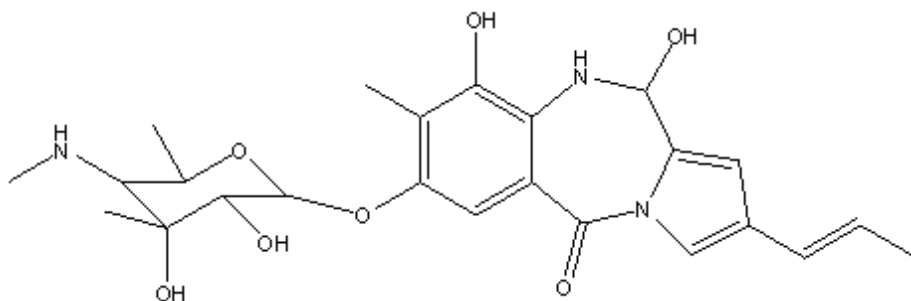
**Obr. 1** Základní chemická struktura pyrrolo-1,4-benzodiazepinů

Sibiromycin je bílý krystalický prášek, který je rozpustný v methanolu, acetonitrilu a dichlormethanu, částečně rozpustný v chloroformu a ethylacetátu a nerozpustný ve vodě při pH 7. UV spektrum sibiromycinu obsahuje dvě charakteristická maxima, a to při 230 a 310 nm. Sibiromycin je stabilní v čisté krystalické formě nebo ve 100% roztoku methanolu.

V roce 1970 byl sibiromycin izolován pomocí sloupcové chromatografie na iontové výměnných pryskyřicích obsahujících silný katex (funkční skupina  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) a extrakcí v systému kapalina-kapalina (LLE).<sup>28</sup> Při testování LLE bylo zjištěno, že sibiromycin je snadno extrahovatelný z vodného roztoku butanolem a z fermentačního média chloroformem, ethylacetátem nebo dichlormethanem, výtěžnost extrakce je závislá na pH daného fermentačního média. Pro separaci od strukturně podobných látek byla použita tenkovrstvá chromatografie. Při detekci byly využívány barevné reakce s manganistanem draselným a roztokem  $\text{Br}_2\text{-H}_2\text{O}$ , které sibiromycin odbarvují a dále reakce s ninhydrinem, chloridem železitým a s diazosloučeninami. Struktura sibiromycinu byla charakterizována pomocí UV, IČ a NMR.<sup>28</sup>

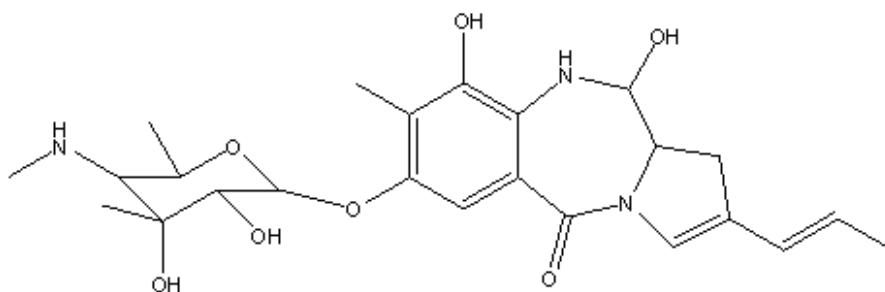
Chemická stabilita sibiromycinu za různých podmínek byla popsána v roce 1974. Bylo zjištěno, že za mírně kyselých podmínek sibiromycin ztrácí vodu a přechází na biologicky inaktivní žlutý krystal anhydrosibiromycin. Při silně kyselém hydrolyze pak anhydrosibiromycin ztrácí aminocukernou složku a vzniká anhydrosibiromycinon.<sup>26</sup>

V roce 1982 byl sibiromycin získán z kmene *Streptosporangium sibiricum* a jeho struktura (Obr. 2) byla charakterizována pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter.<sup>27</sup> Do této doby se struktury sibiromycinu popsané v literatuře shodují.



**Obr. 2 Chemická struktura sibiromycinu (Mr 473,2) popisovaná do roku 1982**

V roce 1988 dochází k rozporu, sibiromycin byl izolován ze stejného kmene, ale zjištěná publikovaná struktura (Obr. 3) se liší v absenci jedné dvojné vazby v pyrrolové části.<sup>13</sup> Tuto skutečnost žádní vědci dosud nekomentovali ani neobjasnili.



**Obr. 3 Chemická struktura sibiromycinu (Mr 475,2) popsaná v roce 1988**

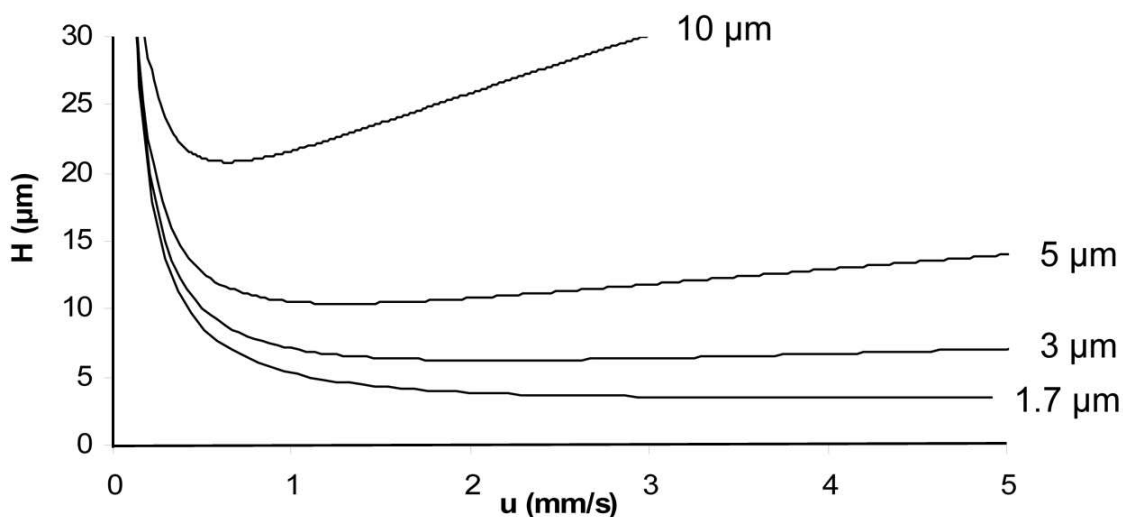
V poslední práci, která se věnuje především popisu biosyntetické dráhy sibiromycinu, vědci uvádějí sibiromycin jako molekulu s relativní molekulovou hmotností ( $M_r$ ) 475,2. Byla zde poprvé uvedena metoda separace sibiromycinu pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV a MS detekcí. Pro tyto účely byla vyvinuta gradientová lineární metoda s použitím mobilních fází kyselina trifluoroctová (TFA)/methanol (MeOH) při průtoku 1 ml/min na Zorbax Eclipse XDB-C8 koloně. Detekce UV byla prováděna při 230 a 310 nm. Hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním módu na průletovém analyzátoru s elektrosprejovou ionizací (HPLC-ESI).<sup>24</sup>



## 2.3 Použitá metodika

### 2.3.1 UPLC

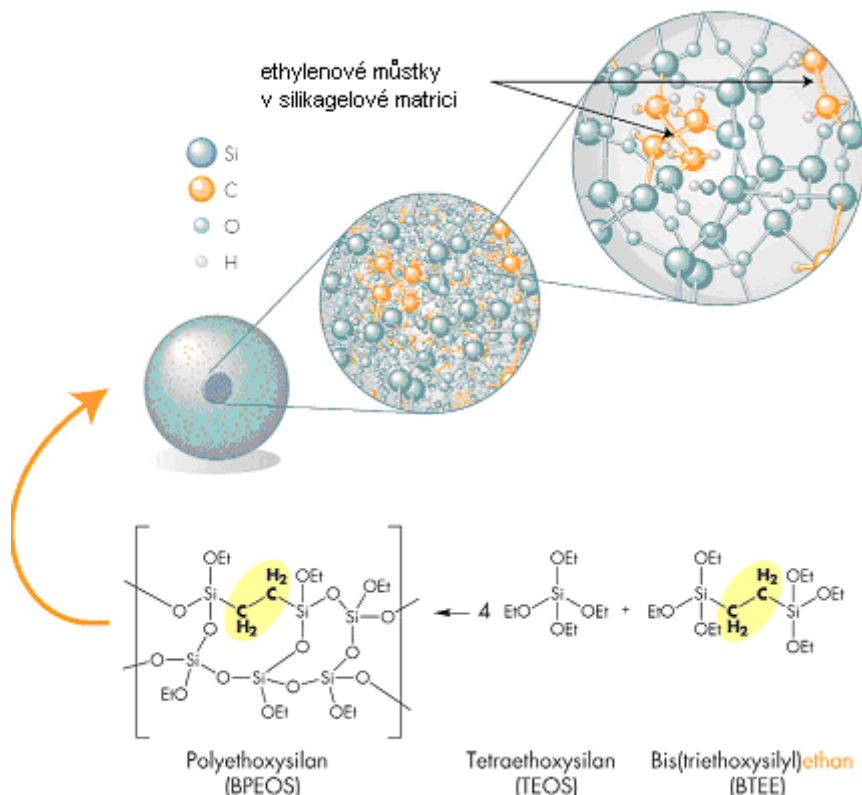
Ultraúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) je metoda, jež pracuje na stejném principu jako HPLC. Hlavními výhodami UPLC jsou větší účinnost a rychlost separace, vyšší citlivost a lepší rozlišení ve srovnání s klasickými HPLC metodami. Tento fakt lze teoreticky odvodit z van Deemterovy křivky, která popisuje závislost mezi lineární průtokovou rychlostí ( $u$ ) a výškovým ekvivalentem teoretického patra ( $H$ ). Minimum křivky odpovídá optimální průtokové rychlosti, při které je účinnost kolony největší. Velikost částic UPLC kolon se pohybuje pod hranicí 2  $\mu\text{m}$ , v případě použité kolony v této práci je to 1,7  $\mu\text{m}$ . Z Obr. 4 je zřejmé, že snižující se velikost částic umožňuje použití vyšších průtokových rychlostí a to při zachování či zvětšení účinnosti, což má vliv na výslednou citlivost a rozlišení.<sup>29, 30</sup>



Obr. 4 Typy van Deemterových křivek při použití různých velikostí částic

Pozn. Přejato z publikace<sup>30</sup>

Nejpoužívanější UPLC sorbenty (Obr. 5) připravené BEH (Ethylene Bridged Hybrid) technologií obsahují modifikovaný silikagel zesíťovaný hybridními ethylenovými můstky, které slouží k zamezení vlivu volných hydroxylových skupin silikagelu a ke zvýšení mechanické a chemické odolnosti sorbentu.<sup>31</sup> UPLC kolony tohoto typu jsou konstituovány tak, aby byly odolné vůči vysokému tlaku (15000 psi, 1000 bar) a dosahují vysoké stability v rozmezí pH 1-12.



**Obr. 5** Struktura UPLC sorbentu založená na BEH technologii

Pozn.: Převzato z publikace<sup>29</sup>

Chromatografická technika UPLC pracuje ve spojení se stejnými typy komerčně dostupných detektorů jako HPLC. Nejčastěji jsou využívány UV/VIS detektory, které mohou být konstituovány pro měření jedné vlnové délky (nastavitelné/fixní) nebo ve formě detektorů diodového pole pro měření v širokém spektru ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti. Často používaný je i selektivní detektor fluorimetrický. Nároky kladené na vysokou přesnost identifikace látek a velmi nízké detekční limity

používaných chromatografických metod vedou ke stále častějšímu propojení s hmotnostními detektory HPLC/MS<sup>32</sup> a UPLC/MS<sup>33, 34</sup>.

Ze závěrečného shrnutí v Tab. 2, která porovnává základní parametry technik HPLC a UPLC, lze vyčíst, že významný rozvoj metody UPLC v posledních 5-6 letech má své opodstatnění.

**Tab. 2 Shrnutí – UPLC vs. HPLC**

<b>Údaje technické (nejčastější)</b>	<b>UPLC</b>	<b>HPLC</b>
tlak	100 MPa	40 MPa
velikost částic	1,7 μm	5 μm
délka kolon	50, 100 mm	150, 250 mm
<b>Údaje chromatografické</b>	<b>UPLC</b>	<b>HPLC</b>
čas analýzy	kratší	delší
spotřeba rozpouštědel	nižší	vyšší
spotřeba vzorku	nižší	vyšší
účinnost separace	vyšší	nižší
množství kvalit. informací	vyšší	nižší
mez detekce	nižší	vyšší
citlivost	vyšší	nižší
rozlišení	vyšší	nižší

### 2.3.2 SPE

Extrakce na tuhé fázi (SPE) je metoda, při které dochází k sorpci analytu z vodného roztoku na pevnou fázi. Ten je pak eluován vhodnou mobilní fází. Tato extrakce se provádí především za účelem eliminace interferujících látek nebo matrice a zakoncentrování hlavního analytu a slouží především pro úpravu vzorků před chromatografickým stanovením. Mechanismus retence při SPE je obdobou mechanismu v kapalinové chromatografii, tudíž i používané sorbenty jsou založené na stejném principu.<sup>35</sup> Při separaci dochází ke vzájemným interakcím mezi analytem a funkčními skupinami pevné fáze.

Ve srovnání s extrakcí v systému kapalina-kapalina (LLE) nese SPE řadu výhod, jako jsou nízká spotřeba rozpouštědel, kratší čas preparace, jednoduchost v provedení celého procesu a snadná automatizace. U SPE není třeba řešit problémy spojené s tvorbou emulze či pěny, což je často příčinou nižší výtěžnosti u LLE. Nevýhodou u SPE kolonek bývá tendence tuhé fáze k vyšší kontaminaci při výrobním procesu, což může vést k nežádoucím interferencím.<sup>36,37,38</sup>

Volba vhodného sorbentu je základním předpokladem úspěšné extrakce. Při jeho výběru je nutné získat možné dostupné informace o povaze analytu a matrice. Na SPE kolonkách lze jako v kapalinové chromatografii pracovat v normálním nebo reverzním módu. Při extrakci v normálním módu jsou na tuhé fázi silikagelu navázané polární funkční skupiny (kyanopropyl, diethylamin) a při interakci s analytem dochází k tvorbě vodíkových vazeb či dipol-dipol interakcí. V tomto systému lze nejnázat extrahovat organické sloučeniny ve formě aminů, alkoholů či karboxylových kyselin. V reverzním módu je na tuhé fázi navázán nepolární uhlovodíkový řetězec (nejčastěji C8, C18 nebo fenyl) a mezi hlavní interakce probíhající mezi sorbentem a analytem se řadí především van der Waalsovy či disperzní síly. Na tomto typu tuhé fáze lze extrahovat především aromatické sloučeniny a uhlovodíky s alifatickým řetězcem. Sorbenty založené na iontové výměně jsou taktéž obdobou kapalinové chromatografie. U tohoto typu dochází k tvorbě iontové vazby mezi analytem a nabitými funkčními skupinami vázanými na pevné fázi. Podle povahy těchto nabitých skupin se sorbenty dělí na katexy a anexy. V případě katexu je na tuhé fázi navázaná záporně nabitá funkční skupina (benzensulfonová, karboxylová kyselina), s níž snadno vytváří iontovou vazbu a tím se dobře extrahují bazické látky. Anexem nejčastěji bývá kladně nabitá kvarterní amoniová

sůl, díky níž lze extrahovat látky kyselé povahy. Charakteristiku výše uvedených a dalších sorbentů uvádí různé publikace zabývající se vývojem SPE metod.<sup>35, 39</sup>

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Chemikálie

K přípravě mobilních fází pro HPLC a UPLC analýzy byl použit: acetonitril LC-MS (99,95 %, Biosolve, Nizozemí), methanol LC-MS (99,95 %, Biosolve, Nizozemí), kyselina mravenčí (98,00 %, Lach-Ner, ČR), hydroxid amonný (25,00 %, Lachema, ČR), kyselina trifluoroctová (99,95 %, Biosolve, Nizozemí) a voda (HPLC gradient grade) připravená reverzní osmózou pomocí Milli-Q (Millipore, USA)

Při LLE extrakci byl použit: ethylacetát (99,70 %, Lach-Ner, ČR), diethylether (99,00 %, Lach-Ner, ČR), hexan (99,00 %, Merck, Německo) a dichlormethan (99,90 %, Chromservis, ČR).

Při SPE extrakci byl použit: methanol LC-MS (99,95 %, Biosolve, Nizozemí), voda (HPLC gradient grade) připravená reverzní osmózou pomocí Milli-Q (Millipore, USA), kyselina octová (99,00 %, Sigma-Aldrich, Německo), kyselina citronová bezvodá (99,50 %, Lach-Ner, ČR), hydrogenfosforečnan sodný (99,00 %, Lachema, ČR) a hydroxid amonný (25,00 %, Lachema, ČR).

Při hmotnostní spektrometrii byl použit: acetonitril LC-MS (99,95 %, Biosolve, Nizozemí) a kyselina octová (99,00 %, Sigma-Aldrich, Německo).

Použitý mikroorganismus: *Streptosporangium sibiricum* DSM 44093.

Pro uchovávání a inokulaci kmene *Streptosporangium sibiricum* bylo použito BG médium (v tekuté i pevné formě). Pro zjišťování rozdílné produkce sibiromycinu byla testována média, která byla připravena dle citovaných publikací: Gause<sup>40</sup>, ISP4<sup>41</sup>, M1<sup>42</sup>, M2<sup>42</sup>, M3<sup>42</sup>, ISPM4<sup>42</sup>, M6<sup>42</sup>, M7<sup>42</sup>, M8<sup>42</sup>, SM<sup>1</sup>, SS<sup>43</sup>, BG (= ISP2<sup>44</sup> + CaCO<sub>3</sub>) a YEME<sup>45</sup>. Složení těchto médií je shrnuto v Tab. 10 v kapitole 6.

Testování biologické aktivity sibiromycinu bylo prováděno na agarové misce se zaočkovanou bakterií *Kocuria rhizophila* CCM552.

## 3.2 Instrumentace

SPE byla prováděna na kolonkách OASIS MCX o objemu 3 ml obsahujících 60 mg sorbentu (Waters, USA).

Pro odstředování vzorků před HPLC a UPLC analýzami byla použita centrifuga Mini Spin plus (Eppendorf AG, Německo).

pH bylo měřeno na pH-metru 538 (WTW, Německo), který byl kalibrován standardy stejné firmy.

UPLC analýzy byly prováděny na ultraúčinném kapalinovém chromatografu Acquity UPLC (Waters, USA) sestávajícího se z vysokotlaké pumpy (Acquity UPLC Solvent Manager), automatického dávkovače (Acquity UPLC Sample Manager), termostatu kolon (Acquity UPLC Column Heater/Cooler) a detektoru diodového pole (Acquity UPLC PDA Detector). Při vývoji vhodné UPLC metody byly vzorky měřeny na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ; Waters, USA). Data byla vyhodnocena programem Empower software (Waters, USA).

HPLC analýzy byly měřeny na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (Waters, USA) vybaveném vysokotlakou pumpou Waters 600, automatickým dávkovačem Waters 717 plus a UV detektorem Waters 486. Vzorky byly preparovány na koloně Synergi Polar-RP (250 mm x 15 mm, 4  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, USA). Data byla taktéž vyhodnocena programem Empower software (Waters, USA).

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru LCQ<sup>DECA</sup> (ThermoQuest, USA) s iontovou pastí a statickým nanelektrosprejem.

### 3.3 Příprava sibiromycinu

#### 3.3.1 Kultivace *S. sibiricum* (Jürgen Felsberg, Csc., Ing. Markéta Jelínková, Csc.)

Inokulum bylo připraveno zaočkováním 25 ml BG média spory z agarové misky s BG médiem a kultivací na třepačce po cca 36 hodin. 50 ml média (dle potřeby) bylo zaočkováno 2,5 ml inokula. Kultivace probíhající na rotační třepačce při 28 °C byla po třech dnech ukončena a kultura byla centrifugována (4 000 ot./min, 10 min, 4 °C). Supernatant (fermentační médium) byl použit k další analýze.

#### 3.3.2 LLE

Vyvinutou LLE metodou bylo fermentační médium extrahováno dvakrát hexanem, poté byl sibiromycin z fermentačního média extrahován třikrát do dichlormethanu. Tyto extrakční kroky byly prováděny vždy v ekvimolárním množství. Mezi jednotlivými kroky bylo fermentační médium centrifugováno (4000 ot./min, 10 min, 4 °C). Frakce dichlormethanu byly na závěr spojeny a odpařeny.

#### 3.3.3 Preparativní HPLC

K finálnímu dočištění sibiromycinu získaného jako primární standard byla použita preparativní HPLC metoda. Sibiromycin byl preparován na koloně Phenomenex Synergi Polar-RP (250 mm x 15 mm, 4 µm). Vzorky byly měřeny isokratickou metodou s použitím mobilních fází 1mM mravenčan amonný o pH 4 - 100% acetonitril (30:70, v/v). Byla zvolena optimální průtoková rychlost 4 ml/min a detekce při 230 nm. Celková doba jedné analýzy byla 30 min s retenčním časem sibiromycinu 21 min. Získané frakce byly spojeny, organický podíl byl odpařen a vzorek byl lyofilizován. Identita izolovaného standardu byla ověřena metodou hmotnostní spektrometrie (MS), získaná spektra jsou součástí kapitoly 4.5.



### 3.3.4 Hmotnostní spektrometrie (RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.)

Experimenty MS a MS<sup>n</sup> analýzy sibiromycinu a jeho přírodních derivátů byly provedeny na hmotnostním spektrometru LCQ<sup>DECA</sup> (ThermoQuest, USA), který používá jako analyzátor iontovou past a ionizačním zdrojem je statický nanoelektrosprej. Napětí na elektrospreji bylo nastaveno na 1,2 kV a na vstupní čočce 30 V. Teplota vyhřívané kapiláry byla 175 °C a napětí 10 V. Hmotnostní spektrum v pozitivním modu bylo měřeno v rozsahu hodnot 150-2000 *m/z*. Pro fragmentaci kolizně indukovanou disociací a následné MS<sup>n</sup> experimenty byla použita kolizní energie v rozsahu 25-40 jednotek, aktivační čas 30 ms a okno pro výběr prekurzoru v rozsahu 3 hmotnostních jednotek. Manuální interpretace dat byla provedena s ohledem na popsaná fragmentační pravidla.

## 3.4 Stanovení sibiromycinu

### 3.4.1 SPE

SPE metoda vyvinutá pro rutinní analýzy byla prováděna na kolonkách Oasis MCX (3ml) obsahujících 60 mg sorbentu. Na počátku každé extrakce byla kolonka kondicionována 1 ml MeOH a následně promyta 1 ml H<sub>2</sub>O. Po tomto kroku byly nanášeny 3 ml fermentačního media obsahujícího sibiromycin. Po zachycení vzorku na sorbentu byla kolonka promyta 3 ml H<sub>2</sub>O, 3 ml MeOH a 1 ml fosfát/citrátového pufru o pH 7,8 v ekvimolárním množství s methanolem. Nakonec byl sibiromycin eluován 1 ml vodného roztoku NH<sub>4</sub>OH-MeOH (1:99, v/v). Eluát byl odpařen na vakuovém koncentrátoru.

### 3.4.2 UPLC

Vzorky byly analyzovány na koloně Acquity UPLC BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) s lineární gradientovou elucí (Tab. 3) s mobilními fázemi MeOH (A) a 0,1% TFA (B) a při optimální průtokové rychlosti 0,4 ml/min, teplotě kolony 55 °C a v rozmezí detekce 200-450 nm. Celková doba analýzy byla 10,1 min, retenční čas sibiromycinu byl 6,3 min.

**Tab. 3 Optimalizovaná UPLC metoda**

Čas (min)	% A	% B
0,0	5	95
10,0	65	35
10,1	5	95

### **3.5 Stanovení biologické aktivity sibiromycinu**

Biologická aktivita byla testována nanesením 5-10  $\mu$ l fermentačního média, izolovaných frakcí nebo čistého sibiromycinu a jeho derivátů na sterilní terčík z filtračního papíru. Po odpaření methanolu byl terčík přiložen na agarovou misku zaočkovanou souvislým povlakem *K. rhizophila*. Inhibice růstu byla zjišťována po 18ti hodinové inkubaci při 30 °C. V případě přítomnosti zóny byla její velikost vyhodnocena změřením jejího průměru.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Optimalizace extrakčních metod

#### 4.1.1 Vývoj LLE

Tato extrakční metoda byla vyvinuta pro zpracování velkého objemu fermentačního média za účelem izolace sibiromycinu jako primárního standardu. Byly prováděny pokusy s cílem nalézt optimální organické rozpouštědlo, kterým by mohl být sibiromycin z vodného fermentačního media snadno extrahován. Nutnou podmínkou, aby tato LLE metoda správně fungovala je, aby se pH fermentačního média po kultivaci pohybovalo v rozmezí 7,0-7,7. Toto rozmezí pH bylo pro nás mimo jiné i ukazatelem správně provedené kultivace. Při vývoji metody byla testována čtyři běžná organická rozpouštědla: ethylacetát, diethylether, hexan a dichlormethan. Po extrakci těmito organickými rozpouštědly byly frakce odpařeny, vzorky rozpuštěny ve 100% MeOH, v němž je sibiromycin dobře rozpustný a následně chromatograficky zanalyzovány. Nejlepší výtěžnost byla zjištěna při extrakci dichlormethanem, který byl zvolen jako optimální rozpouštědlo. Extrakce ethylacetátem měla mnohem menší výtěžnost. Dále bylo ověřeno, že do diethyletheru a hexanu sibiromycin nepřechází. Tato skutečnost byla využita při výběru hexanu jako vhodného rozpouštědla pro přečištění fermentačního média od nežádoucích látek. Tento krok byl potvrzen chromatografickou analýzou, kdy byl extrakt sibiromycinu skutečně významně očištěn po přečištění hexanem.

### 4.1.2 Vývoj SPE

SPE metoda byla vyvinuta jako rutinní extrakční metoda prekoncentrace vzorků sibiromycinu. Jak již bylo napsáno, prvním krokem pro vývoj a výběr vhodné SPE metody je zvolení vhodného sorbentu. Z hlediska bazické povahy sibiromycinu byly vybrány kolonky MCX založené na kationtové výměně. Byl vyvinut následující postup, který zahrnoval kondicionaci kolonky, nanesení vzorku, vymytí slabě kyselých látek a eluci vlastního analytu.

Postup:

#### **OASIS MCX 60 mg (Waters)**

1 ml MeOH, 1 ml H<sub>2</sub>O

3 ml fermentačního media (sibiromycin)

3 ml H<sub>2</sub>O

3 ml 0,5% CH<sub>3</sub>COOH

3 ml MeOH

1 ml fosfát/citrátového pufru pH 7,8 – MeOH (50:50, v/v)

eluce: 3 ml NH<sub>4</sub>OH – MeOH (1:99, v/v)

Přítomnost sibiromycinu v konečném eluátu byla chromatograficky testována vyhodnocením retenčních časů a absorpčních maxim nalezených látek. Absorpční maxima sibiromycinu 230 a 310 nm nevykazovala žádné nesrovnalosti. Pro úplné ověření identity eluátu byla použita hmotnostní spektrometrie. Z výsledků vyplynulo, že se touto procedurou sibiromycin převede na jeho methoxy-derivát, který vzniká reakcí s methanolem v kyselém prostředí. Tento pokus byl ověřen i s ethanolem, kdy byl ve výsledném eluátu identifikován ethoxy-derivát. Toto významné zjištění bylo využito při dalších MS analýzách, které byly také nutno okyselovat, tudíž bylo vhodnější sibiromycin rozpouštět v acetonitrilu (ACN), kde tento derivát nevzniká. V případě SPE metody bylo zjištěno, že tento derivát vzniká při promývání methanolem, kdy je kolonka okyselena 0,5% kyselinou octovou, která má eluovat slabě

kyselá látka, ale jak se ukázalo, tento krok byl v případě daného fermentačního média zbytečný a byl následně vyřazen.

Výsledný postup SPE metody:

**OASIS MCX 60 mg (Waters)**

1 ml MeOH, 1 ml H<sub>2</sub>O

3 ml fermentačního média (sibiromycin)

3 ml H<sub>2</sub>O

3 ml MeOH

1 ml fosfát/citrátového pufru pH 7,8 – MeOH (50:50, v/v)

eluče: 3 ml NH<sub>4</sub>OH – MeOH (1:99, v/v)

Při vývoji metody byly jednotlivé eluáty ze všech dílčích kroků SPE testovány UPLC metodou na přítomnost sibiromycinu. V žádné z frakcí nebyl sibiromycin nalezen, z čehož plyne, že celková koncentrace zachycená na pevné fázi byla eluována až v posledním potřebném kroku.

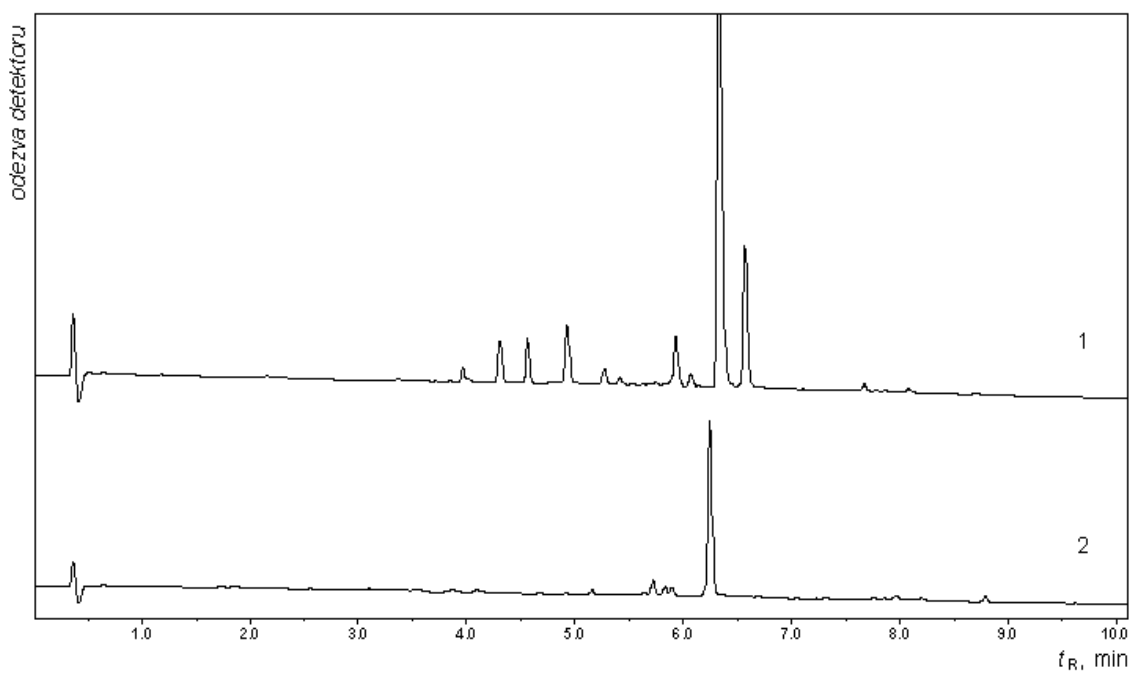
### 4.1.3 Srovnání SPE a LLE

Bylo zjištěno, že SPE metoda je oproti LLE vhodnější při sériových stanoveních malých množství sibiromycinu. Nejenže je LLE více pracná, časově náročnější a spotřebovává velké množství toxických rozpouštědel, ale také dochází k významným ztrátám sibiromycinu především v důsledku tvorby emulze, tudíž je metoda málo reprodukovatelná a výtěžná. Výtěžnost a reprodukovatelnost SPE a LLE metody (Tab. 4) byla zjištěna přidáním vzorků sibiromycinu o známé koncentraci (5 a 25 µg/ml) do media neobsahujícího sibiromycin (blank) a následným provedením dané extrakční techniky šestkrát na každé z koncentračních hladin. Číselné hodnoty výtěžnosti a reprodukovatelnosti byly získány poměrem koncentrace sibiromycinu nalezené po provedení extrakční metody a skutečné koncentrace sibiromycinu přidané před vlastním provedením extrakční metody. Odchylka stanovení vyjadřuje reprodukovatelnost extrakční metody.

**Tab. 4 Výtěžnost SPE a LLE metody**

Metoda	Koncentrace (µg/ml)	Výtěžnost a reprodukovatelnost (%)
SPE	5	71,66 ± 3,55
	25	74,75 ± 5,18
LLE	5	31,67 ± 21,07
	25	35,34 ± 21,66

Jak vyplývá z Tab. 4, SPE metoda je dvakrát výtěžnější a má výrazně lepší reprodukovatelnost. Na Obr. 6 je zobrazeno porovnání obou technik, kterými lze sibiromycin s retenčním časem 6,3 min získat. Výhodou SPE extrakce je, že se během tohoto izolačního procesu neztrácí dříve eluující látky (s retenčním časem 3,0-5,5 min) jako v LLE. Jak bylo v této studii zjištěno, jedná se o deriváty sibiromycinu, které byly v dřívějších pracích, kde se používala pouze LLE, přehlédnuty.



**Obr. 6 Porovnání UPLC analýzy sibiromycinu izolovaného pomocí SPE a LLE**

*Separáční podmínky:* kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% MeOH, (B) 0,1% TFA, gradient (min/% A) 0/5; 10,0/65; 10,1/5, teplota kolony 55 °C, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

*Chromatogramy:* 1. Izolace sibiromycinu pomocí SPE

2. Izolace sibiromycinu pomocí LLE



## 4.2 Optimalizace chromatografických metod

### 4.2.1 Vývoj UPLC

Hlavním cílem bylo vyvinout UPLC metodu pro rutinní analýzy během genetických a mikrobiologických pokusů, čemuž předcházelo testování různých typů kolon, mobilních fází a podmínek.

Byly testovány UPLC kolony BEH Phenyl, BEH Shield a BEH C18, z nichž poslední jmenovaná má nejširší oblast pH stability a poskytovala nejlepší separace.

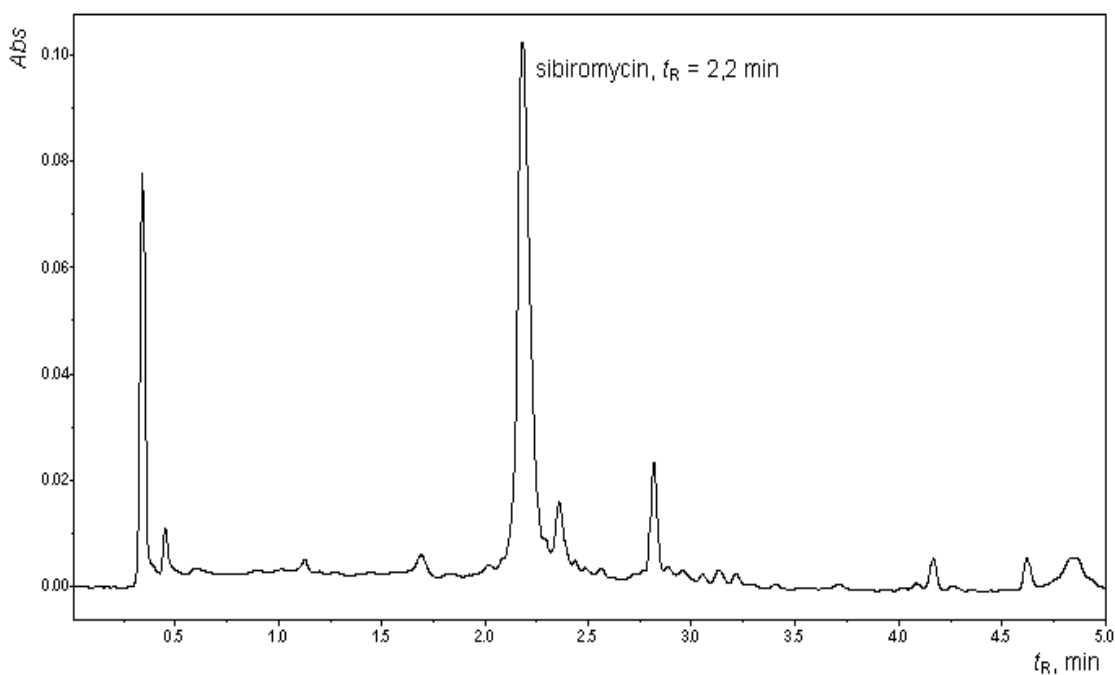
Již při vývoji SPE metody bylo zjištěno, že hodnota pH má na sibiromycin značný vliv, nevhodné pH vede k jeho degradaci, což bylo ověřeno i prvotní volbou chromatografické separace v alkalickém prostředí. Tato volba byla zcela nevhodná, sibiromycin nebylo možné za těchto podmínek stanovit, byl zcela degradován. Z tohoto důvodu byl testován vliv pH na chromatografickou separaci v rozsahu 3-10 a byly sledovány změny v symetrii píku. Symetrie píku se zlepšovala od pH 3 do pH 4, při pH 4,5 a vyšším začala symetrie píku významně klesat a s rostoucím pH postupně docházelo k výraznější deformaci píku. Pro následující analýzy byla zvolena hodnota pH 4.

V dalším kroku bylo zjištěno složení vhodné mobilní fáze. V kapalinové chromatografii se v reverzním módu nejčastěji používají rozpouštědla ACN, MeOH a H<sub>2</sub>O. Pro prvotní analýzy byl zvolen acetonitril a jako pufr 1mM mravenčan amonný o pH 4. Při tomto složení mobilní fáze byla vyvinuta gradientová metoda (Tab. 5). UPLC chromatogram za těchto podmínek je uveden na Obr. 7. Z chromatogramu lze pozorovat nedostatečnou separaci na zadní straně píku sibiromycinu ( $t_R = 2,2$  min), koeluce interference se sibiromycinem byla navíc prokázána MS detekcí, proto bylo potřeba metodu modifikovat.

**Tab. 5 Metoda 1**

Čas (min)	% A	% B
0,0	10	90
5,0	50	50
6,0	100	0
6,1	10	90

*SeparáčnÍ podmínky:* kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% ACN, (B) 1mM HCOONH<sub>4</sub> pH 4, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

**Obr. 7 UPLC chromatogram sibiromycinu analyzovaného metodou 1**

*SeparáčnÍ podmínky:* kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% ACN, (B) 1mM HCOONH<sub>4</sub> pH 4, gradient (min/% A) 0/10; 5,0/50; 6,0/100; 6,1/10, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

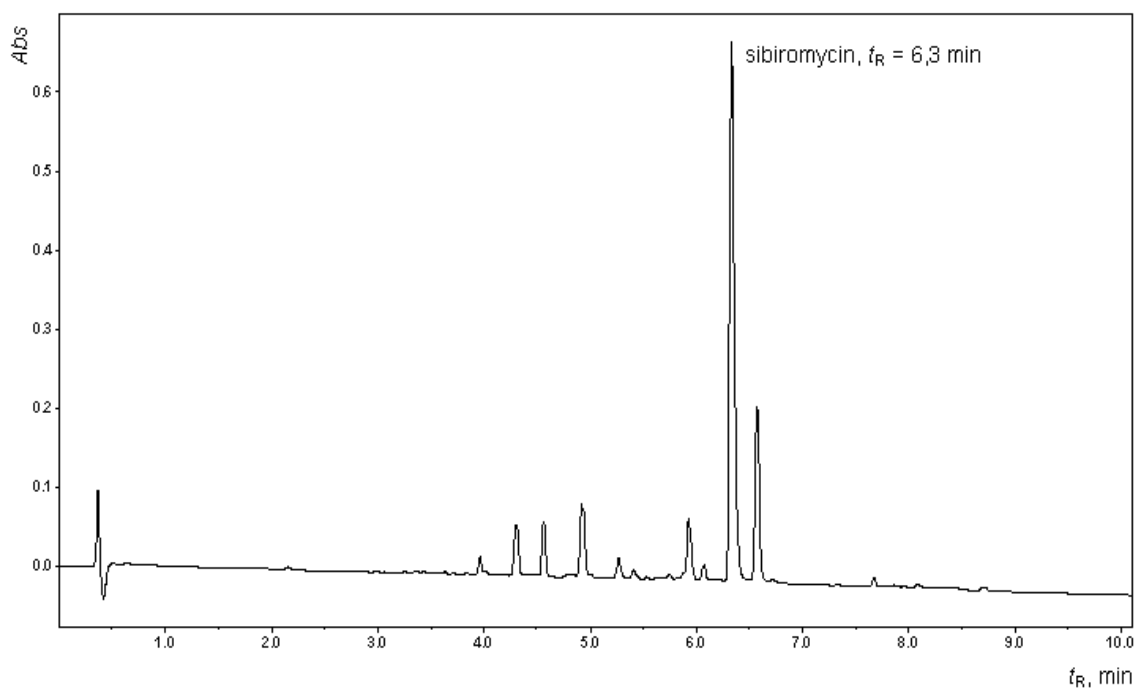
Acetonitril byl nahrazen methanolem, organickým modifikátorem s nižší eluční silou a mravenčan amonný 0,1% kyselinou trifluoroctovou, která jako iontově-párové činidlo interaguje se separovanými molekulami a zvyšuje jejich afinitu k povrchu stacionární fáze. Při tomto složení mobilní fáze a při modifikaci gradientu bylo docíleno prodloužení retenčního času sibiromycinu ( $t_R = 6,3$  min) a optimální separace. Posledním optimalizačním parametrem byla teplota, která byla testována v rozmezí 30-55 °C, a byl sledován její vliv na retenční čas sibiromycinu a na symetrii píku. Zvyšující se teplota kolony měla pozitivní vliv na symetrii píku, retenční čas se neměnil. Byla zvolena optimální teplota kolony 55 °C. Tato maximální teplota byla zvolena také s ohledem na doporučení výrobce kolon (maximální teplota 60 °C) a možnost degradace sibiromycinu při analýze. Vyvinutá lineární gradientová metoda je shrnuta v Tab. 6.

**Tab. 6 Metoda 2 (optimalizovaná UPLC metoda)**

Čas (min)	% A	% B
0,0	5	95
10,0	65	35
10,1	5	95

*Separáční podmínky:* kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% MeOH, (B) 0,1% TFA, teplota kolony 55 °C, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

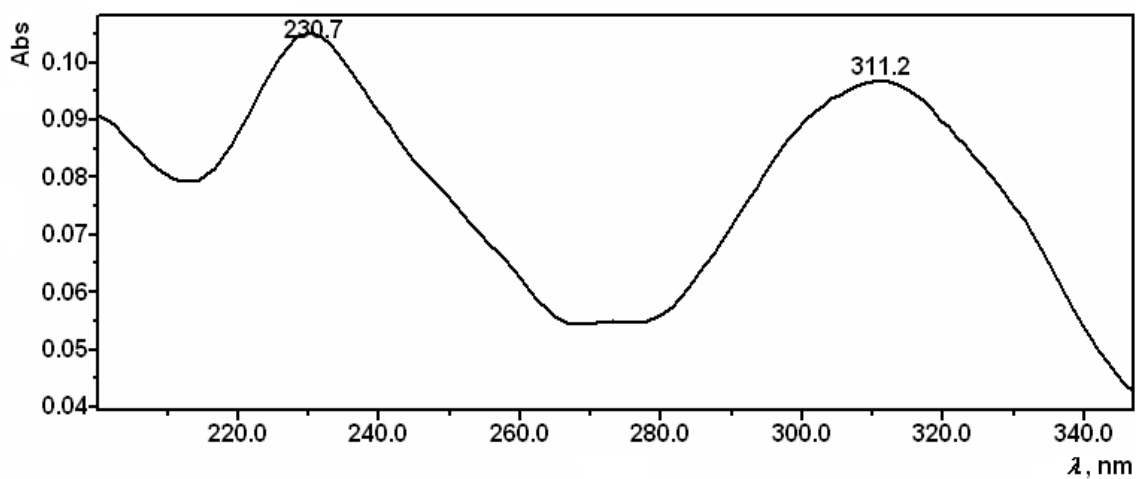
Tato metoda umožnila spolu s prekoncentrační SPE metodou nalézt kromě vysoce čistého sibiromycinu i další významné látky, které *Streptosporangium sibiricum* produkuje. Tyto látky byly identifikovány pomocí MS a popsány v kapitole 4.5. UPLC chromatogram za těchto podmínek je uveden na Obr. 8.



**Obr. 8 UPLC chromatogram sibiromycinu analyzovaného metodou 2**

*Separáčn*í podmínky: kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% MeOH, (B) 0,1% TFA, gradient (min/% A) 0/5; 10,0/65; 10,1/5, teplota kolony 55 °C, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

Při takto provedené UPLC analýze bylo získáno pomocí PDA detektoru UV spektrum sibiromycinu (Obr. 9), které odpovídalo UV spektru popsanému v literatuře.<sup>14,28</sup>



**Obr. 9 UV spektrum sibiromycinu**

## 4.2.2 Vývoj preparativní HPLC

Preparativní HPLC metoda byla vyvinuta za účelem finálního přečištění sibiromycinu po LLE používaného v celé práci jako standard. Při vývoji metody byly použity a srovnány 2 kolony Phenomenex Luna a Phenomenex Synergi. Pro tyto účely byla zvolena kolona Phenomenex Synergi Polar-RP, která poskytovala lepší separaci.

Mobilní fáze byla přejata z první testované UPLC metody, tj. 100% ACN a 1mM HCOONH<sub>4</sub> pH 4. V případě HPLC preparace byl zvolen ACN, neboť bylo nutné vyhnout se nežádoucí methanolýze. Také uvedený pufr byl k sibiromycinu šetrnější než TFA používaná při rutinních analýzách. Byly však zcela změněny podmínky separace, byl zvolen isokratický mód, který nevyžaduje dlouhé prodlevy při ekvilibraci. Vliv obsahu organického modifikátoru na retenci a separaci sibiromycinu byl sledován v rozsahu 30 – 70 obj. %. Zvyšující se obsah acetonitrilu měl pozitivní vliv na separaci a retenci. Podařilo se optimalizovat metodu s isokratickou elucí o složení mobilní fáze 1mM mravenčan amonný o pH 4 a 100% ACN (30/70, v/v) při optimální průtokové rychlosti 4 ml/min.

Vlnová délka detekce sibiromycinu 230 nm byla zvolena na základě literárních údajů<sup>14,28</sup> a na základě spektra zobrazeného na Obr. 9, které bylo získáno pomocí optimalizované UPLC metody.

Takto vyvinutou HPLC metodou ve spojení s LLE se podařilo získat 4 mg čistého standardu (97 %), který sloužil především pro potřeby validace UPLC metody.

## 4.3 Validace UPLC metody

Částečná validace metody byla provedena podle validačního protokolu<sup>46</sup>.

### 4.3.1 Kalibrační křivka

Kalibrační přímka byla proměřena v lineárním rozsahu 3,9–250,0 µg/ml, při vyšší koncentraci sibiromycinu se projevila značná nelinearita. Roztoky o koncentraci 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125,0 a 250,0 µg/ml, z nichž byla kalibrační závislost sestrojena, byly připraveny naředěním zásobního roztoku o koncentraci 500,0 µg/ml 100% methanolem. Rovnice lineární regrese vyhodnocená z ploch píků má tvar:

$$y = 1,18 \cdot 10^4 x - 1,13 \cdot 10^4 \quad (1)$$

Korelační koeficient  $R$  dané rovnice má hodnotu 0,999.

### 4.3.2 Mez stanovitelnosti (LOQ), mez detekce (LOD)

Mez stanovitelnosti (LOQ) je nejnižší koncentrace kalibrační křivky, kterou lze stanovit s přesností do 20 % a správností v rozmezí 80-120 %. Mez detekce (LOD) označuje nejnižší koncentraci, která je danou metodou detekovatelná. Jako mez stanovitelnosti byla označena hodnota koncentrace 3,9 µg/ml a je ověřena v následující kapitole (4.3.3) v Tab. 7. Mez detekce odpovídá hodnotě 1,2 µg/ml.

Výše uvedené parametry se vztahují k možnostem použité instrumentace. Jestliže uvažujeme prekoncentraci stanovované látky z fermentačního média, pak je tato hodnota tolikrát menší, kolikrát bylo provedeno zakoncentrování analytu. V daném případě došlo k třicetinásobnému zakoncentrování stanovované látky, tudíž mez stanovitelnosti metody ( $LOQ_M$ ) je 130 ng/ml a mez detekce metody ( $LOD_M$ ) je 40 ng/ml.

### 4.3.3 Přesnost

Přesnost je definována jako míra shody výsledků opakovaného měření homogenního vzorku. Hodnoty s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) do 15 % se posuzují jako přijatelné. Přesnost metody byla stanovována na třech koncentračních hladinách 3,9 (LOQ); 15,6 a 125  $\mu\text{g/ml}$ , přičemž každý z kontrolních vzorků byl měřen šestkrát. U každé koncentrační hladiny byla vypočítána RSD (Tab. 7).

**Tab. 7** Vyhodnocení přesnosti metody

Skutečná koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)
125,0	4,3
15,6	2,2
3,9	5,7

### 4.3.4 Správnost

Správnost je definována jako odchylka od správné (skutečné) hodnoty. Pro vyhodnocení správnosti metody byla prováděna měření sibiromycinu na třech koncentračních hladinách 3,9 (LOQ); 15,6 a 125,0  $\mu\text{g/ml}$ , každá koncentrační hladina byla měřena šestkrát. Vyhodnocené číselné hodnoty správnosti metody v procentech uvádí Tab. 8.

**Tab. 8** Vyhodnocení správnosti metody

Skutečná koncentrace ( $\mu\text{g/ml}$ )	Správnost (%)
125,0	96,7
15,6	102,5
3,9	92,2

### 4.3.5 Výtěžnost

Výtěžnost metody je dána poměrem množství analytu získaného danou extrakční metodou k referenční hodnotě koncentrace. Pro zjištění výtěžnosti SPE metody byly prováděny extrakce vzorků o známé koncentraci přidaných do media (blank). Byly prováděny extrakce na dvou koncentračních hladinách 5 a 25  $\mu\text{g/ml}$ , každá koncentrační hladina byla testována šestkrát. Z výsledků byla vypočtena výtěžnost SPE metody, která měla při koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$  hodnotu  $71,66 \pm 3,55 \%$  a na koncentrační hladině 25  $\mu\text{g/ml}$  měla hodnotu  $74,75 \pm 5,18 \%$ , což mimo jiné uvádí i Tab. 4.

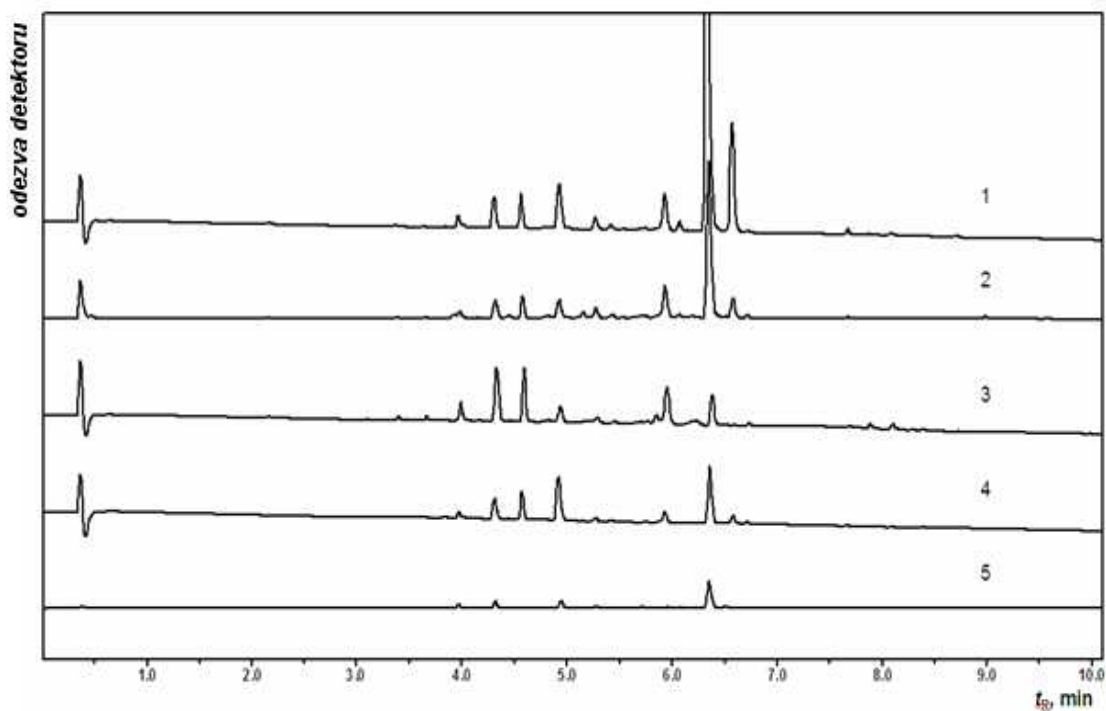
### 4.3.6 Stabilita

Pro stabilitní studii byly vybrány roztoky sibiromycinu rozpuštěné v MeOH o dvou koncentračních hladinách (7,8 a 125,0  $\mu\text{g/ml}$ ).<sup>46</sup> Vzorky byly hodnoceny z hlediska krátkodobé a dlouhodobé stability. Krátkodobá stabilita dává informace o stabilitě vzorku během jednoho dne při teplotě 25 °C a určuje, jak se vzorkem zacházet během zpracování. Vzorky byly měřeny po 0, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hod. Díky testování dlouhodobé stability lze zjistit stálost vzorků uchovávaných při teplotě -20 °C v delším časovém intervalu. Vzorky byly měřeny po 0, 1, 2, 3, 7 a 14 dnech. Pro tuto stabilitní studii byly vzorky na obou koncentračních hladinách rozděleny do vialek po 50  $\mu\text{l}$  na každý den stabilitního měření, aby se zabránilo degradaci vzorku způsobeným opětovným rozmrazováním. Vyhodnocením krátkodobé a dlouhodobé stability bylo zjištěno, že sibiromycin rozpuštěný v MeOH je za daných podmínek stabilní, nedochází k jeho degradaci. Dále bylo zjištěno, že při zamrazení vzorků při dlouhodobé stabilitě dochází po delší době k mírnému zakoncentrování vzorků.



## 4.4 Produkce sibiromycinu na různých typech médií

Produkce sibiromycinu byla testována na různých typech médií, shrnutí a popis těchto médií uvádí Tab. 10 v kapitole 6. Z celkových 13 testovaných médií byla pro znázornění vybrána média SM, SS, Gause, M3 a M7, která se významně liší v produkci sibiromycinu (Obr. 10). Vysokou produkcí sibiromycinu se vyznačují SM a M7 médium, naopak nízká produkce sibiromycinu byla objevena na M3 a SS médiu. Díky tomuto pokusu byla navíc na médiích zjištěna produkce dalších látek a to taktéž s rozdílnou intenzitou v závislosti na typu média. Produkce sibiromycinu na médiu M3 je téměř nulová, vznikají zde však jeho deriváty, které jsou mnohem polárnější než sibiromycin a jejich struktura byla objasněna a je popsána v kapitole 4.5. Porovnávací studie rozdílné produkce na jednotlivých médiích nebyla doposud popsána. Tato studie je klíčem ke sporu, který se vede o špatně popsanou chemickou strukturu sibiromycinu. V této práci bylo zjištěno, že kmen *S. sibiricum* produkuje obě již dříve popsané struktury, ale v závislosti na médiu a kultivačních podmínkách. Některá média produkují pouze sibiromycin s jednou dvojnou vazbou v pyrrolové části ( $Mr$  475,2) a některá produkují jak sibiromycin s jednou dvojnou vazbou ( $Mr$  475,2), tak s dvěma dvojnými vazbami v pyrrolové části ( $Mr$  473,2). Podrobnější informace budou předmětem další studie.



**Obr. 10** Porovnání produkce *Streptosporangium sibiricum* na různých typech médií

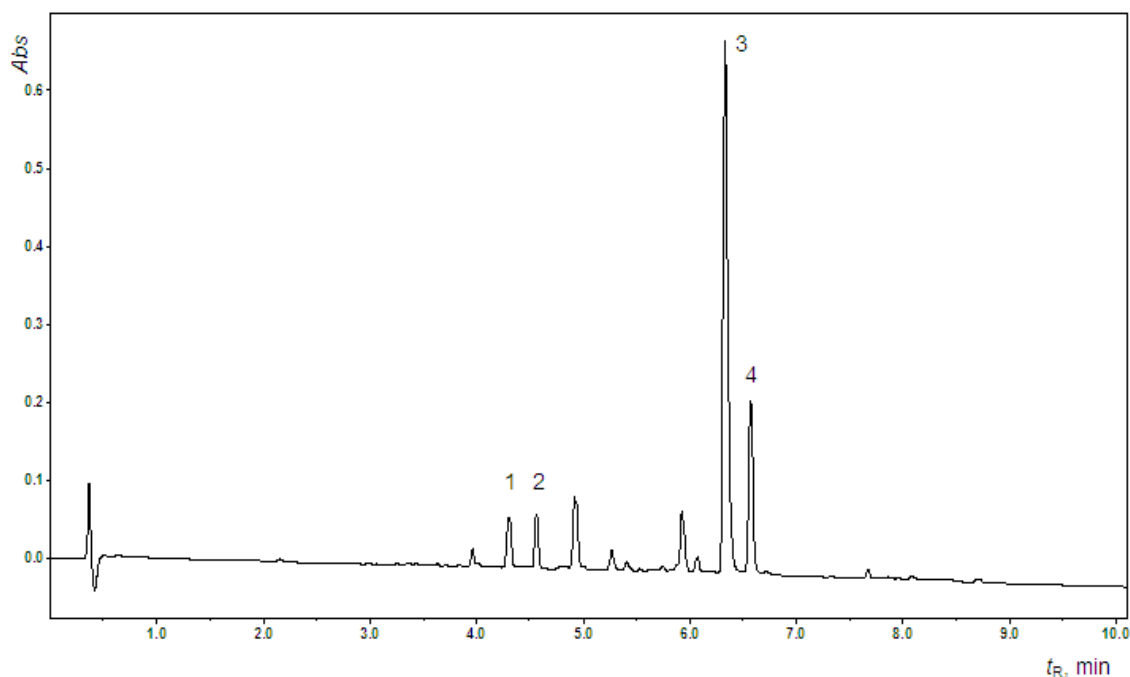
*Separční podmínky:* kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% MeOH, (B) 0,1% TFA, gradient (min/% A) 0/5; 10,0/65; 10,1/5, teplota kolony 55 °C, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

*Chromatogramy:*

1. Produkce na SM médiu
2. Produkce na M7 médiu
3. Produkce na M3 médiu
4. Produkce na Gause médiu
5. Produkce na SS médiu

## 4.5 Identifikace sibiromycinu a jeho derivátů na základě hmotnostní spektrometrie (RNDr. Miroslav Šulc, Ph.D.)

UPLC off-line MS technikou byla potvrzena existence obou typů sibiromycinu a byly identifikovány další, dříve nepopsané deriváty sibiromycinu. Každá izolovaná a vysušená UPLC frakce (1-4, Obr. 11) byla rekonstituována sonikací v 50% ACN s přídavkem 0,5% kyseliny octové (v/v) a analyzována hmotnostní spektrometrií.



**Obr. 11 UPLC analýza látek izolovaných SPE metodou z SM media**

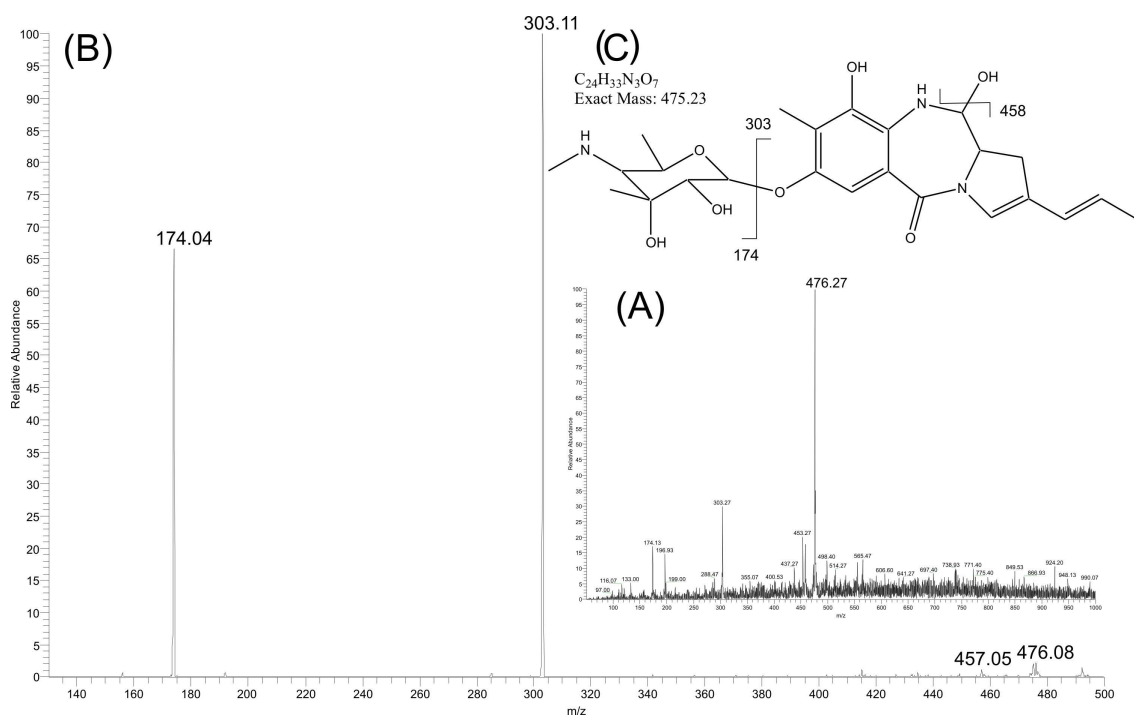
*Separáčn*í podmínky: kolona Acquity UPLC BEH C18, mobilní fáze (A) 100% MeOH, (B) 0,1% TFA, gradient (min/% A) 0/5; 10,0/65; 10,1/5, teplota kolony 55 °C, průtoková rychlost 0,4 ml/min, detekce UV 200-450 nm.

Frakce 1 a 2: cukerné deriváty obou typů sibiromycinu s  $M_r$  646,3 (1) a 648,3 (2)

Frakce 3: sibiromycin s  $M_r$  475,2 (Sib1)

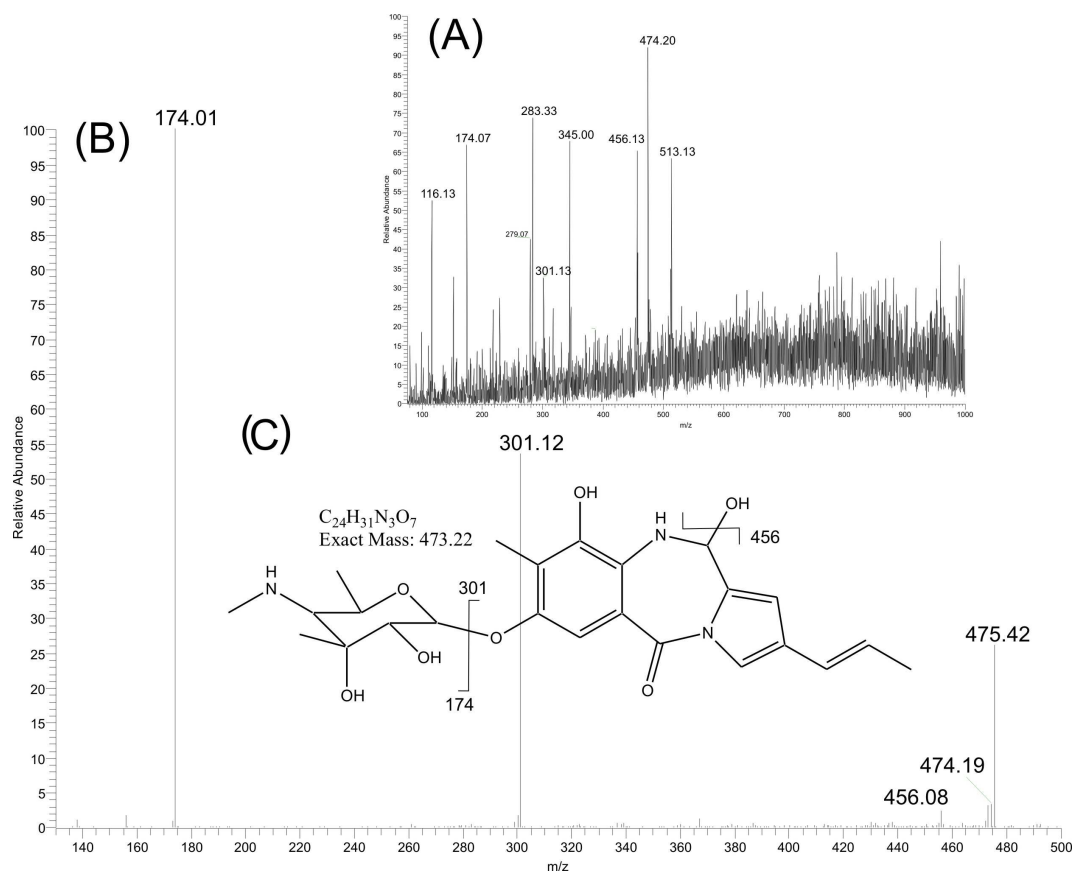
Frakce 4: sibiromycin s  $M_r$  473,2 (Sib2)

Následující hmotnostní spektra potvrzují existenci obou typů sibiromycinu, jak s přítomností jedné dvojné vazby v pyrrolové části s  $M_r$  475,2 (Sib1) a sumárním vzorcem  $C_{24}H_{33}N_3O_7$  (Obr. 12), tak se dvěma dvojnými vazbami v pyrrolové části s  $M_r$  473,2 (Sib2) a sumárním vzorcem  $C_{24}H_{31}N_3O_7$  (Obr. 13). Označení Sib1 a Sib2 bylo použito pouze pro přehlednost v této práci a nomenklatura bude upřesněna po dokončení celého projektu.



**Obr. 12 Hmotnostní spektrum UPLC frakce 3 (Sib1)**

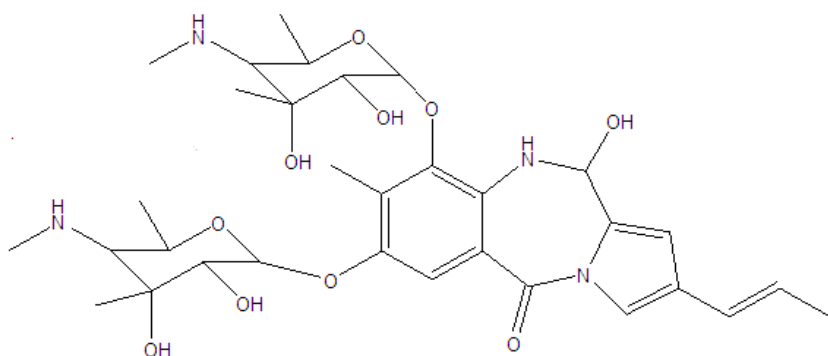
(A) Hmotnostní spektrum dané UPLC frakce, (B) MS/MS spektrum prekurzoru o  $m/z$  476.2, (C) fragmentační schéma předpokládané molekuly.



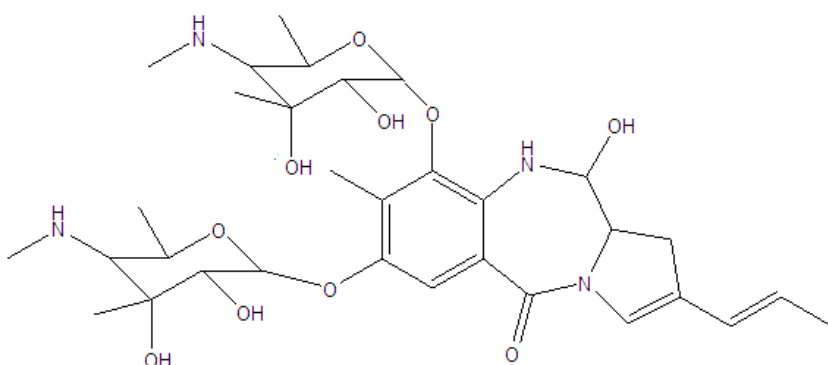
**Obr. 13 Hmotnostní spektrum UPLC frakce 4 (Sib2)**

- (A) Hmotnostní spektrum dané UPLC frakce, (B) MS/MS spektrum prekurzoru o  $m/z$  474.2, (C) fragmentační schéma předpokládané molekuly.

Dále byly pomocí MS identifikovány chemické struktury cukerných derivátů obou typů sibiromycinu, které nebyly doposud v žádné z publikací popsány. Jejich struktury jsou zobrazeny na Obr. 14 a Obr. 15 a odpovídají frakcím 1 a 2.



**Obr. 14 Chemická struktura cukerného derivátu sibiromycinu s Mr 646,3 a sumárním vzorcem  $C_{32}H_{46}N_4O_{10}$  (frakce 1)**



**Obr. 15 Chemická struktura cukerného derivátu sibiromycinu s Mr 648,3 a sumárním vzorcem  $C_{32}H_{48}N_4O_{10}$  (frakce 2)**

Jelikož se jedná o nové látky, které vykazují také biologickou aktivitu na *K. rhizophila* (Tab. 9), bude předmětem další studie jejich izolace ve větším množství (řádově 1-5 mg) a bude nutné určit jejich strukturu pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR).

## 4.6 Stanovení biologické aktivity

Biologická aktivita fermentačního média, izolovaných frakcí a čistých látek byla stanovena pomocí testování inhibice růstu *Kocuria rhizophila*. V Tab. 9 je uvedena intenzita biologické aktivity fermentačních médií, jež byla vybrána pro znázornění rozdílné produkce sibiromycinu (jako v kapitole 4.4) a dále také intenzita biologické aktivity frakcí látek 1-4, jež byly identifikovány pomocí MS (4.5).

**Tab. 9 Biologická aktivita fermentačních médií a izolovaných frakcí**

FERMENTAČNÍ MÉDIUM	BIOLOGICKÁ AKTIVITA
SM	+++
M7	+++
M3	+
Gause	++
SS	0

FRAKCE	BIOLOGICKÁ AKTIVITA
1 ( <i>Mr</i> 646,3)	+
2 ( <i>Mr</i> 648,3)	+
3 ( <i>Mr</i> 475,2)	+++
4 ( <i>Mr</i> 473,2)	+++

Pozn.: +++ = vysoká, ++ = střední, + = nízká, 0 = velmi nízká až žádná biologická aktivita

Tento rychlý a jednoduchý test byl ukazatelem intenzity biologické aktivity a sloužil jako efektivní kontrola úspěšné kultivace a následných extrakčních kroků.

## 5 ZÁVĚR

Zásadní a prvotní problém této práce bylo získání standardu sibiromycinu, který není komerčně dostupný a je velice nestabilní. Postup extrakce byl sice v minulosti popsán, ale jak se ukázalo, nebyl příliš efektivní a chyběly znalosti o tom, jak a za jakých podmínek se sibiromycinem pracovat. Pro potřeby optimalizace a validace metody stanovení sibiromycinu UPLC metodou se nakonec podařilo izolovat 4 mg čistého standardu (97,0 %).

Dále bylo zjištěno, že dříve užívaná LLE extrakce je mnohem méně výtěžná a reprodukovatelná než nově vyvinutá SPE. Jejimi dalšími nespornými výhodami je především její snadnost a rychlost provedení. Cenným poznatkem byla skutečnost, že metodou LLE dochází k úplné ztrátě derivátů sibiromycinu, které jsou polárnější než sibiromycin. Jedná se o látky, které mají ve své struktuře navíc cukernou jednotku a jejich  $M_r$  je 646,3 a 648,3. Při testování rozdílné produkce *S. sibiricum* na různých typech médií bylo zjištěno, že některé z derivátů jsou dokonce přednostně produkovány na daném typu média.

Díky testování produkce na různých médiích pomocí nově vyvinuté SPE a UPLC metody s off-line identifikací pomocí MS byl vyřešen spor o špatně popsanou strukturu sibiromycinu. Bylo zjištěno, že existují obě dvě struktury sibiromycinu (Sib1, Sib2) a to jak s  $M_r$  475,2, tak s  $M_r$  473,2. Výše zmíněné cukerné deriváty jsou odvozené právě od těchto dvou struktur a jejich přítomnost je důkazem, že *S. sibiricum* produkuje obě molekuly Sib1 a Sib2. Stejně jako oba typy sibiromycinu, tak i jejich cukerné deriváty vykazují biologickou aktivitu. Další nevyřešené otázky budou předmětem budoucího výzkumu.



## 6 PŘÍLOHY

Tab. 10 Složení médií testovaných na produkci *Streptosporangium sibiricum*

Složení/Média	Gause	ISP4	M1	M2	M3	ISPM4	M6	M7	M8	SM	SS	BG	YEME
glukóza				+	+			+	+		+	+	+
sacharóza	+												+
KNO <sub>3</sub>	+												
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	+	+				+						+	
CaCO <sub>3</sub>	+	+								+			
Škrob		+				+							
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O		+				+							
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O													+
NaCl		+								+			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		+				+							
Stopové prvky		+											
Kvasničný extrakt			+	+	+			+	+		+	+	+
Sladový extrakt			+					+	+		+	+	+
Glycerol			+										
Sójový pepton			+										
Pepton				+	+								+
Hovězí extrakt				+	+								
Kukuřičný extrakt					+				+				
Nutriční bujon							+						
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>							+						
Soyoton										+			
Kukuřičný škrob										+			

## 7 LITERATURA

---

1. Gause, G. F.; Preobrazhenskaia, T. P.; Ivanitskaia, L. P.; Sveshnikova, M. A.: Production of the antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum* sp. nov. culture, *Antibiotiki* 14, 963-969 (1969)
2. Hurley, L. H.; Petrusek, R.: Proposed structure of the anthramycin-DNA adduct, *Nature* 282, 529-531 (1979)
3. Takeuchi, T.; Miyamoto, M.; Ishizuka, M.; Naganawa, H.; Kondo, S.; Hamada, M.; Umezawa, H.: Neothramycins A and B, new antitumor antibiotics, *The Journal of Antibiotics* 29, 93-96 (1976)
4. Kunimoto, S.; Masuda, T.; Kanbayashi, N.; Hamada, M.; Naganawa, H.; Miyamoto, M.; Takeuchi, T.; Umezawa, H.: Mazethramycin, a new member of anthramycin group antibiotics, *The Journal of Antibiotics* 33, 665-667 (1980)
5. Tsunakawa, M.; Kamei, H.; Konishi, M.; Miyaki, T.; Oki, T.; Kawaguchi, H.: Prothramycin, a new antibiotic of the anthramycin group: Production, isolation, structure and biological activity, *The Journal of Antibiotics* 41, 1366-1373 (1988)
6. Arima, K.; Kohsaka, M.; Tamura, G.; Imanaka, H.; Sakai, H.: Studies on tomaymycin, a new antibiotic. I. Isolation and properties of tomaymycin, *The Journal of Antibiotics* 25, 437-444 (1972)
7. Shimizu, K.-I.; Kawamoto, I.; Tomita, F.; Morimoto, M.; Fujimoto, K.: Prothracarcin, a novel antitumor antibiotics, *The Journal of Antibiotics* 35, 972-978 (1982)
8. Aoki, H.; Miyairi, N.; Ajisaka, M.; Sakai, H.: Dextrochrysin, a new antibiotic, *The Journal of Antibiotics* 22, 201-206 (1969)
9. Konishi, M.; Hatori, M.; Tomita, K.; Sugawara, M.; Ikeda, Ch.; Nishiyama, Y.; Imanishi, H.; Miyaki, T.; Kawaguchi, H.: Chicamycin, a new antitumor antibiotic. I. Production, isolation and properties, *The Journal of Antibiotics* 37, 191-199 (1984)
10. Ward-Rainey, N.; Rainey, F. A.; Stackebrandt, E.: The phylogenetic structure of the genus *Streptosporangium*, *Systematic and applied microbiology* 19, 50-55 (1996)

- 
11. Okuda, T.; Ito, Y.; Yamaguchi, T.; Furamai, T.; Suzuki, M.; Tsuruoka, M.: Sporaviridin, a new antibiotic produced by *Streptosporangium viridogriseum* nov. sp., *The Journal of Antibiotics* 19, 85-87 (1966)
  12. Lazzarini, A.; Cavaletti, L.; Toppo, G.; Marinelli, F.: Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek* 78, 399-405 (2000)
  13. Leber, J. D.; Hoover, J. R. E.; Holden, K. G.; Johnson, R. K.; Hecht, S. M.: A revised structure for sibiromycin, *Journal of the American Chemical Society* 110, 2992-2993 (1988)
  14. Hurley, L. H.: Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics. Comparative aspects of anthramycin, tomaymycin and sibiromycin, *The Journal of Antibiotics* 30, 349-370 (1977)
  15. Puvvada, M. S.; Forrow, S. A.; Hartley, J. A.; Stephenson, P.; Gibson, I.; Jenkins, T. C.; Thurston, D. E.: Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase *in vitro* transcription by DNA-binding pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines, *Biochemistry* 36, 2478-2484 (1997)
  16. Shorin, V. A.; Rossolimo, O. K.: Experimental studies on antitumor activity of sibiromycin, *Antibiotiki* 15, 300-304 (1970)
  17. Ilyushina, N. G.; Goldberg, L. E.: Pharmacological studies on sibiromycin, *Antibiotiki* 15, 612-617 (1970)
  18. Brahme, N. M.; Gonzalez, J. E.; Rolls, J. P.; Hessler, E. J.; Mizensak, S.; Hurley, L. H.: Biosynthesis of the lincomycins, 1. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of the propyl- and ethyl-L-hygric acid moieties of lincomycins A and B, *Journal of the American Chemical Society* 106, 7873-7878 (1984)
  19. Hurley, L. H.; Lasswell, W. L.; Malhotra, R. K.; Das, N. V.: Pyrrolo-1,4-benzodiazepines antibiotics. Biosynthesis of the antitumor antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum*, *Biochemistry* 18, 4225-4229 (1979)
  20. Hurley, L. H.; Gairola, Ch.: Pyrrolo-1,4-benzodiazepine antitumor antibiotics: Biosynthetic studies on the conversion of tryptophan to the anthranilic acid

- 
- moieties of sibiromycin and tomaymycin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15, 42-45 (1979)
21. Hurley, L. H.: Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo-1,4-benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin and sibiromycin, *Accounts of Chemical Research* 13, 263-269 (1980)
  22. Kamal, A.; Rao, M. V.; Reddy, B. S. P.: The newer synthetic strategies for DNA binding pyrrolbenzodiazepine antibiotics, *Chemistry of Heterocyclic Compounds* 34, 1588-1604 (1998)
  23. Reddy, B. S. P.; Sondhi, S. M.; Lown, J. W.: Synthetic DNA minor groove-binding drugs, *Pharmacology and Therapeutics* 84, 1-111 (1999)
  24. Li, W.; Khular, A.; Chou, S.; Sacramo, A.; Gerratana, B.: Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic, *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2869-2878 (2009)
  25. Baraldi, P. G.; Cacciari, B.; Guiotto, A.; Romagnoli, R.; Zaid, A. N.; Spalluto, G.: Heterocyclic analogs of DNA minor groove alkylating agents, *Current Pharmaceutical Design* 4, 249-276 (1998)
  26. Mesentsev, A. S.; Kuljaewa, V. V.; Rubasheva, L. M.: Structure of sibiromycin, *The Journal of Antibiotics* 27, 866-873 (1974)
  27. Parker, K. A.; Babine, R. E.: Revision of assignment of structure to the pyrrolo-diazepinone antitumor antibiotic sibiromycin, *Journal of the American Chemical Society* 104, 7330-7331 (1982)
  28. Brazhnikova, M. G.; Konstantinova, N. V.; Mesentsev, A. S.: Sibiromycin: Isolation and characterization, *The Journal of Antibiotics* 25, 668-673 (1972)
  29. Schwarz, M. E.; Murphy, B. J.: Ultra performance liquid chromatography: tomorrow's HPLC technology today, *Lab Plus international* 18, 6-9 (2004)
  30. Nguyen, D. T.-T.; Guillarme, D.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.: Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of Separation Science* 29, 1836-1848 (2006)
  31. Grumbach, E. S.; Wheat, T. E.; Kele, M.; Mazzeo, J. R.: Developing columns for UPLC: Design considerations and recent developments. Dostupné z URL: [www.chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com) [cit. 21.2.2010]

- 
32. Burger, A. M.; Loadman, P. M.; Thurston, D. E.; Schultz, R.; Fiebig, H. H.; Bibby, M. C.: Preclinical pharmacology of the pyrrolbenzodiazepine (PBD) monomer DRH-417 (NSC 709119), *Journal of chemotherapy* 19, 66-78 (2007)
  33. Plumb, R.; Castro-Perez, J.; Granger, J.; Beattie, I.; Joncour, K.; Wright, A.: Ultra-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orthogonal time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Communications in mass spectrometry* 18, 2331-2337 (2004)
  34. Guillarme, D.; Schappler, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L.: Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry, *Trends in Analytical Chemistry* 29, 15-27 (2010)
  35. Hennion, M.-C.: Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 856, 3-54 (1999)
  36. Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F.: A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments, *Chromatographia* 40, 474-483 (1995)
  37. Kataoka, H.: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis, *Trends in Analytical Chemistry* 22, 232-244 (2003)
  38. Poole, C. F.: New trends in solid-phase extraction, *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362-373 (2003)
  39. Smith, R. M.: Before injection-modern methods of sample preparation for separation techniques, *Journal of Chromatography A* 1000, 3-27 (2003)
  40. Řeháček, Z.: Isolation of Actinomycetes and the assay of the number of their germs in the soil, *Mikrobiologia* 2, 236-241 (1959)
  41. Shirling, E. B.; Gottlieb, D.: Methods for characterization of *Streptomyces* species, *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 3313-3340 (1966)
  42. Boudjella, H.; Bouti, K.; Zitouni, A.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N.: Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil, *Journal of Applied Microbiology* 103, 228-236 (2007)

- 
43. Hopwood, D. A.; Bibb, M. J.; Chater, K. F.; Kieser, T.; Bruton, C. J.; Lydiate, D. J.; Smith, C. P.; Ward, J. M.: *Genetic Manipulation of Streptomyces: a Laboratory Manual*, Norwich, The John Innes Foundation 1985
  44. Hesseltine, C. W.; Benedict, R. G.; Pridham, T. G.: Useful criteria for species differentiation in the genus *Streptomyces*, *Annals of the New York Academy of Sciences* 60, 136-151 (1954)
  45. Kieser T.; Chater K. F.; Bibb M. J.; Buttner M. J.; Hopwood D. A.: *Practical Streptomyces Genetics*, Norwich, The John Innes Foundation 2000
  46. CDER/CBER, Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research (2001)