

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

IZOLACE A CHARAKTERIZACE BIOLOGICKY
AKTIVNÍCH LÁTEK

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF
BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Zdeňka Kameníka a školitele-garanta RNDr. Karla Nesměráka, PhD. 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 17.3. 2010

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce byla izolace a částečná identifikace biologicky aktivních látek, které jsou produkovány aktinomycetami a které jsou potenciálně využitelné v lékařství jako antibiotika. Kultivační média aktinomycet obsahující jejich metabolity byla přečištěna a prekoncentrována pomocí extrakce na tuhé fázi. Získaný extrakt byl testován na biologickou aktivitu Kirby-Bauer testem pomocí citlivého kmene *Kocuria rhizophila*. Biologicky aktivní metabolity byly analyzovány a izolovány pomocí ultraúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí (detektor diodového pole). Izolované látky byly podrobeny analýze hmotnostní spektrometrií, kterou byly získány experimentální hodnoty relativních molekulových hmotností jednotlivých neznámých látek. Tyto hodnoty byly porovnány s relativními molekulovými hmotnostmi látek uvedených v chemické databázi zahrnující přírodní látky včetně antibiotik. Bylo zjištěno, že neznámé biologicky aktivní látky neodpovídají žádným dosud objeveným antibiotikům uvedených v databázi, z čehož lze usuzovat, že se jedná o nová antibiotika. Pro určení jejich struktury je třeba provést další experimenty hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetické rezonance.

Klíčová slova: aktinomycety, antibiotika, SPE, UPLC, HPLC

Předmětová hesla: analýza sekundárních metabolitů, test biologické aktivity, izolace biologicky aktivních látek, identifikace neznámých látek, vyhledávání nových antibiotik

Abstract

This Bachelor thesis aims at isolation and partial identification of biologically active substances which are produced by actinomycetes and can be potentially applied in medicine. Cultivation broths of actinomycetes containing their metabolites were purified and pre-concentrated by solid phase extraction. Then, the bioassay of the extracts by Kirby-Bauer test using the sensitive strain *Kocuria rhizophila* was performed. Biologically active metabolites were analyzed and isolated by ultra-performance liquid chromatography with photo diode array detector. Isolated substances were assayed by mass spectrometry, which yielded relative molecular mass values of the unknown compounds. The values were compared with relative molecular masses of compounds listed in a chemical database, which involves natural products including antibiotics. We revealed that the unknown biologically active substances do not refer to any already discovered compound present in the database suggesting that the unknown compounds may be novel. More mass spectrometry and nuclear resonance experiments have to be carried out in order to elucidate their structure.

Key words: actinomycetes, antibiotics, SPE, UPLC, HPLC

Subject heading: analysis of secondary metabolites, bioassay test, isolation of biologically active compounds, identification of unknown substances, new antibiotics discovery

Poděkování

Tato bakalářská práce byla vypracována v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v Laboratoři genetiky, fyziologie a bioinženýrství hub.

Na tomto místě bych chtěla poděkovat školiteli této bakalářské práce Mgr. Zdeňku Kameníkovi a školiteli-garantovi RNDr. Karlu Nesměrákovi, PhD. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. RNDr. Miroslavu Šulcovi, PhD. děkuji za provedení analýz hmotnostní spektrometrie a pomoc při jejich vyhodnocení. Za kritické připomínky k této práci bych ráda poděkovala Mgr. Daně Ulanové, PhD. Dále bych ráda poděkovala za pomoc, podporu a příjemné pracovní prostředí i RNDr. Janě Olšovské, PhD. a Mgr. Tereze Tylové.

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1	ANTIBIOTIKA	9
1.1.1	Sekundární metabolity a antibiotika	9
1.1.2	Producenti antibiotik	9
1.1.3	Klasifikace antibiotik	10
1.1.3.1	Dělení podle původu	10
1.1.3.2	Dělení podle biologické aktivity	10
1.1.3.3	Dělení podle mechanismu účinku	11
1.1.3.4	Dělení podle chemické struktury	11
1.1.3.5	Dělení podle biosyntetické dráhy	11
1.1.4	Vlastnosti vybraných skupin antibiotik	12
1.1.4.1	Tetracykliny	12
1.1.4.2	Nepolyenová makrolidová antibiotika	13
1.1.4.3	Polyenová makrolidová antibiotika	15
1.1.4.4	Linkosamidy	16
1.1.4.5	Aminoglykosidy	17
1.1.5	Rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům	18
1.1.6	Objev a vývoj nových antibiotik	18
1.2	TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY	19
1.2.1	Druhy testů biologické aktivity	19
1.2.1.1	Diskový difúzní test (Kirby-Bauer test)	19
1.2.1.2	E-test	20
1.2.1.3	Zřed'ovací zkumavkový test	20
1.2.2	Mikroorganismy používané pro testy biologické aktivity	21
1.3	EXTRAKCE KULTIVAČNÍHO MÉDIA	21
1.3.1	Extrakce kapalina – kapalina	21
1.3.2	Extrakce na pevné fázi	22
1.4	INSTRUMENTÁLNÍ METODY	23
1.4.1	Ultra účinná kapalinová chromatografie	24
1.4.2	Hmotnostní spektrometrie	25
1.5	CÍL PRÁCE	27
1.6	VÝBĚR POUŽITÝCH METOD	27
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
2.1	CHEMIKÁLIE	28
2.2	KULTIVACE AKTINOMYCET	28
2.3	EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI	29
2.4	TESTY BIOLOGICKÉ AKTIVITY	29
2.5	ULTRA ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE	30
2.5.1	UPLC analýza	30
2.5.2	UPLC preparace	30
2.6	EXPERIMENTÁLNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	31
3	VÝSLEDKY A DISKUSE	32
3.1	UPLC ANALÝZA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A IZOLACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK	32

3.2	MS ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK.....	37
4	ZÁVĚR	45
5	LITERATURA	46

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AU	Absorbance Units
BEH	Bridged Elhyl Hybrid (sor bent pro UPLC, Waters)
CCA	α -kyanoskořicová kyselina
CID	kolizně indukovaná disociace (collision-induced dissociation)
DNA	kyselina deoxyribonukleová
FA	kyselina ferulová
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
H	výškový ekvivalent teoretického patra
HLB	Hydrophilic-Lipophilic-Balanced (sor bent pro extrakci tuhou fází, Waters)
m/z	poměr hmotnost ku náboji fragmentu
MALDI	ionizace laserem za přítomnosti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionisation)
MEKC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (micellar electrokinetic chromatography)
M_r	relativní molekulová hmotnost
p	tlak (psi; ba; MPa)
PDA detektor	detektor diodového pole (photo diode array detector)
PSD	post source decay (MS/MS technika)
RPM	počet otáček za minutu
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)
t	čas (min)
TFA	trifluoroctová kyselina
TOF	analyzátor oddělující ionty bez unášivého pole jen podle jejich kinetické energie (time-of-flight)
u	lineární rychlost (mm/s)
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie (ultra performance liquid chromatography)
UV detekce	detekce ultrafialovým zářením (ultraviolet)

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 ANTIBIOTIKA

1.1.1 Sekundární metabolity a antibiotika

Organismy produkují a vylučují do prostředí mnoho takzvaných sekundárních metabolitů. Jedná se o látky, které jsou pro udržení životních funkcí organismu postradatelné (růst a reprodukce buňky), ale jsou nezbytné pro přežití biologického druhu v souvislosti s jeho přirozeným okolím¹. Přesný původ a funkce sekundárních metabolitů nebyly doposud plně objasněny. Pokud tyto látky inhibují růst (množení) mikroorganismů nebo je usmrcují, označují se jako antibiotika².

Antibiotika jsou nízkomolekulární látky o molární hmotnosti nižší než 2000 g mol⁻¹ (výjimkou jsou některá peptidová antibiotika, která mají molekulovou hmotnost mnohem vyšší). Z chemického hlediska se jedná o látky velmi různorodých struktur. Antibiotika jsou využívána v humánní i veterinární medicíně především k léčbě nebo prevenci různých infekčních onemocnění.

1.1.2 Producenti antibiotik

Antibiotika produkuje mnoho organismů, především bakterie, řasy, houby, lišejníky, ale i některé vyšší rostliny či živočichové¹. Producenti antibiotik jsou přehledně uvedeni v Tab. 1.

Hlavními producenty jsou především bakterie a některé houby (např. rody *Penicillium*, *Aspergillus*). Z bakteriálních producentů jsou to hlavně aktinomycety, produkující téměř polovinu všech známých antibiotik, z nichž mezi ty komerčně využívané patří chloramfenikol (produkuje *Streptomyces venezuelae*), streptomycin (*S. griseus*) nebo tetracyklin (*S. rimosus*)³. Antibiotika produkovaná aktinomycetami nejsou pouze antibakteriální, některá vykazují také antimykotický, protinádorový a méně častěji antivirový účinek¹. Aktinomycety jsou stále považovány za významný zdroj nových bioaktivních látek⁴.

Tab. 1 Druhy producentů a počet produkovaných antibiotik⁵

Producent	Počet produkovaných antibiotik
Bakterie (mimo aktinomycet)	1400
Aktinomycety	7900
Houby	2600
Lišejníky	150
Řasy	700
Vyšší rostliny	5000
Živočichové	1700

1.1.3 Klasifikace antibiotik

Antibiotika jsou látky velmi různorodých vlastností a lze je klasifikovat podle mnoha hledisek. Pro vytvoření základní představy o těchto látkách je dále uvedeno jejich rozdělení podle původu, biologické aktivity, mechanismu účinku, chemické struktury a jejich biosyntetické dráhy.

1.1.3.1 Dělení podle původu

Dle původu lze antibiotika rozdělit na ta, která jsou produkována:

- a) mikroorganismy (aktinomycety, houby, mykobakterie apod.)
- b) vyššími rostlinami, řasami a lišejníky
- c) živočichy

1.1.3.2 Dělení podle biologické aktivity

Podle biologických účinků můžeme antibiotika rozdělit do několika skupin:

- a) antibakteriální úzkospektrá
- b) antibakteriální širokospektrá
- c) antivirální
- d) antitrypanosomální
- e) antiplasmodiální
- f) antiprotozoální
- g) antitrichomonální
- h) antikokcidiální

1.1.3.3 Dělení podle mechanismu účinku

Na základě mechanismu účinku dělíme antibiotika do následujících skupin:

- a) antibiotika způsobující inhibici syntézy buněčné stěny (např. peniciliny)
- b) antibiotika způsobující poruchy funkce cytoplasmatické membrány (např. azoly, polymyxiny)
- c) antibiotika způsobující inhibici syntézy bílkovin (např. makrolidy, tetracykliny)
- d) antibiotika způsobující inhibici syntézy nukleových kyselin (např. aminokumariny)

1.1.3.4 Dělení podle chemické struktury

Dle chemické struktury dělíme antibiotika do mnoha skupin:

- a) Aminoglykosidy a aminocyklitoly (isepamicin, neomycin)
- b) β -laktamy – cefalosporiny (cefazaflur, ceforanide)
- c) β -laktamy – peniciliny (benzylpenicilin, azidocilin)
- d) Chloramfenikol, thiamfenikol apod.
- e) Kumariny (novobiocin)
- f) Cyklické peptidy (bacitracin, gramicidin)
- g) Glykopeptidy (vankomycin)
- h) Linkosamidy (klindamycin, linkomycin)
- i) Makrolidy (klaritromycin, erytromycin)
- j) Tetracykliny (demeklocyklin, doxycyklin)

1.1.3.5 Dělení podle biosyntetické dráhy

Podle způsobu syntézy dělíme antibiotika do těchto kategorií:

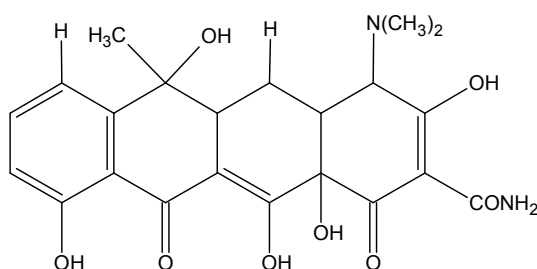
- a) antibiotika syntetizovaná z jednoho základního stavebního bloku – např. chloramfenikol
- b) antibiotika syntetizovaná z několika základních jednotek, např. linkomycin
- c) antibiotika syntetizovaná polykondenzací z několika stejných prekurzorů, případně enzymaticky modifikovaná s jinými strukturami, vznikajícími v jiných metabolických drahách, např. glykopeptidy a makrolidy

1.1.4 Vlastnosti vybraných skupin antibiotik

Podrobný popis jednotlivých skupin antibiotik se týká pouze těch skupin, které jsou produkovány aktinomycetami a jsou tak předmětem této bakalářské práce. U aktinomycet byla objevena produkce velmi různorodých biologicky aktivních látek, které jsou v současné době využívány jako léčiva. Mezi nejvýznamnější skupiny patří makrolidy (jsou tvořeny sacharidovou částí a laktonovým kruhem), linkosamidy (sacharidová a aminokyselinová část), tetracykliny (aromatické sloučeniny, chinoidní struktury), aminoglykosidy a další¹.

1.1.4.1 Tetracykliny

Nejdůležitější tetracyklinová antibiotika (chlortetracyklin, oxytetracyklin, tetracyklin) byla objevena v letech 1948 až 1954. Z chemického hlediska jsou tetracykliny přírodního nebo semi-syntetického původu odvozené od systému čtyř šestičlenných cyklů (1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a-oktahydronaftacen), mají tedy tetracyklický aromatický skelet s rozsáhlým stupněm substituce (Obr. 1).



Obr. 1 Struktura tetracyklinu

Biologická aktivita

Tetracykliny mají široké spektrum antibakteriální aktivity. Působí bakteriostaticky na většinu G⁺ a G⁻ bakterií, dále působí proti spirochetám, mycoplasmatům, rickettsiím a některým virům. Nepatrné změny ve struktuře antibiotika mění významně jeho aktivitu.

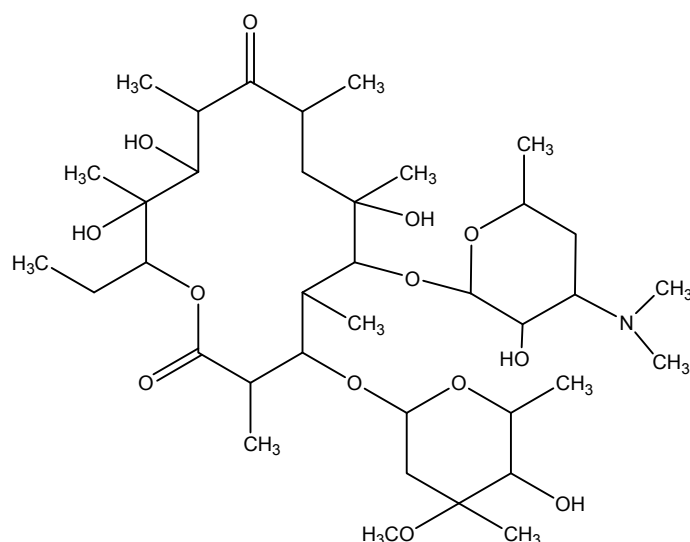
Chemická analýza

V chemické literatuře je např. popsána metoda TLC s UV detekcí ke stanovení tetracyklinu, oxytetracyklinu a chlortetracyklinu v mléce⁶. TLC⁷ s denzitometrickou

detekcí bylo dále použito k analýze doxycyklinu. Tetracykliny se ale obvykle stanovují reverzní HPLC. K detekci se nejčastěji využívá UV detekce, protože tetracykliny v UV oblasti velmi dobře absorbují. Takto byly stanoveny doxycylin v séru⁸, moči⁹ nebo minocyklin, oxytetracyklin, doxycylin aj. v mléce¹⁰ a ve svalu¹¹. Mezi další způsob detekce tetracyklinů patří MS, která byla využita pro analýzu tetracyklinů v mléce¹², nebo povrchové¹³ a odpadní¹⁴ vodě. Méně často se pro analýzu tetracyklinů využívá HPLC s fluorescenční detekcí. V medu byl takto stanoven oxytetracyklin a tetracyklin¹⁵, v mléce a séru oxytetracyklin, doxycylin, tetracyklin a chlortetracyklin¹⁶. Další možný způsob detekce ve spojení s HPLC je pulsní amperometrická detekce, která byla použita pro stanovení tetracyklinu, chlortetracyklinu, oxytetracyklinu a doxycyklinu ve svalu a mléce¹⁷ nebo chemiluminiscenční detekce pro analýzu tetracyklinů v mléce¹⁸. Kromě HPLC lze dále využít metody CZE¹⁹ nebo MEKC²⁰.

1.1.4.2 Nepolyenová makrolidová antibiotika

Makrolidová antibiotika zauímají v současné době jednu z prvních pozic na trhu s antibiotiky. Prvním klinicky využívaným antibiotikem byl erytromycin (Obr. 2), který byl zaveden do klinické praxe roku 1952. Molekula těchto antibiotik je tvořena ze dvou částí. První, tzv. aglykon, je výsledkem polyketidové metabolické dráhy. Lze ho charakterizovat jako vysoce větvený, často polynenasycený makrocyclický lakton. Druhá část je tvořena sacharidem. Nejčastěji se jedná o amino- nebo deoxysacharidy. Makrolidová antibiotika tvoří velmi rozsáhlou skupinu sloučenin. Pro klasifikaci se používá velikost makrocyclického laktonového kruhu, který může být 12ti, 14ti, 16ti nebo 17ti členný.



Obr. 2 Struktura erytromycinu

Biologická aktivita

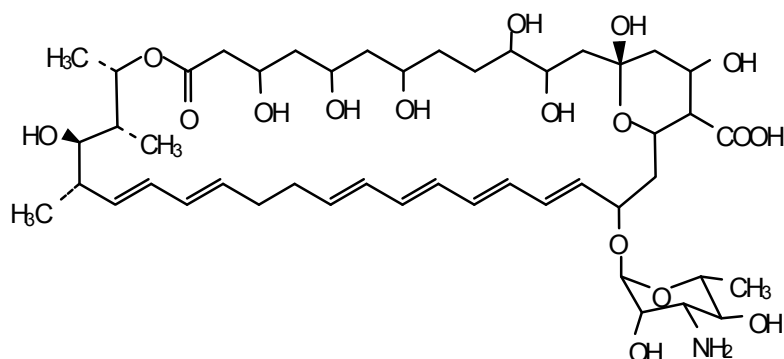
Antimikrobiální spektrum makrolidů je poměrně úzké. Nepolyenová makrolidová antibiotika se vyznačují vysokou aktivitou proti G⁺ bakteriím. Neúčinnost vůči některým G⁻ bakteriím je způsobena strukturou vnější membrány, která neumožňuje proniknutí antibiotika do buňky. Vůči člověku vykazují tyto látky velmi nízkou toxicitu.

Chemická analýza

Ke stanovení nepolyenových makrolidů se využívá metody GC, kterou byl stanoven např. erytromycin a jeho deriváty²¹ a dále především HPLC s různými detekčními metodami. Pro stanovení erytromycinu v séru a moči byla využita UV detekce²². Erytromycin, azitromycin a další makrolidy byly po předchozí derivatizaci detekovány fluorescencí²³. V dnešní době se velmi často využívá také elektrochemická detekce, např. coulometrická a amperometrická detekce pro stanovení makrolidů v lidské moči²⁴ a biologických matricích^{25,26}. Lze využít také MS detekci, která byla popsána např. pro simultánní stanovení makrolidů a dalších antibiotik v odpadních a říčních vodách²⁷ nebo screening 42 reziduálních antibiotik v medu²⁸.

1.1.4.3 Polyenová makrolidová antibiotika

Tyto látky vznikají podobným mechanismem jako nepolyenová makrolidová antibiotika. Liší se velikostí aglykonu a hlavně biologickou aktivitou. Prvním zástupcem těchto „polyenů“ byl nystatin (fungicidin) izolovaný v roce 1950. V současnosti je známo několik set sloučenin. Makrocyclický laktonový kruh obsahuje 26 až 38 uhlíkových atomů. Na něm je dále vázána cukerná složka a v některých případech také aromát. Polyeny jsou amfipatické sloučeniny. Jedna část laktonového kruhu je rigidní, planární a lipofilní (je tvořena systémem 3 až 7 konjugovaných dvojných vazeb), druhá polyhydroxylovaná část je flexibilní a hydrofilní (Obr. 3).



Obr. 3 Struktura nystatinu

Biologická aktivita

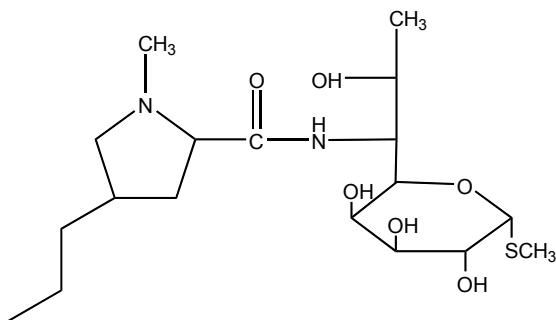
Mají nejširší spektrum účinnosti ze všech používaných antifungálních látek. Tato skupina je, oproti jiným antibiotikům, účinná také proti eukaryotním buňkám. Preparáty se používají proti kvasinkám, houbám, prvokům či řasám. Jejich antibakteriální účinek je zanedbatelný. Po perorální aplikaci se nevstřebávají a po parenterálním podání jsou značně toxická.

Chemická analýza

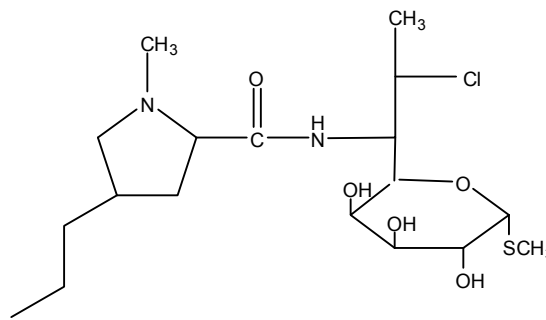
Z polyenových makrolidů je nejčastěji stanovován nystatin, a to metodou HPLC s různými detekčními technikami. Pro jeho analýzu v plazmě a tkáních byla využita UV detekce²⁹. V lidských slinách byl nystatin detekován jak UV detekcí, tak fluorescenčně³⁰.

1.1.4.4 Linkosamidy

Tato skupina antibiotik zahrnuje linkomycin (Obr. 4) a jeho semi-syntetické deriváty, např. klindamycin (Obr. 5). Linkomycin byl poprvé izolován roku 1963. Jeho molekula se skládá ze dvou stavebních jednotek, cukerné (methylthiolinkosamid) a aminokyselinové (propylprolin), které jsou dále spojeny amidovou vazbou. Klindamycin se připravuje chlorací linkomycinu a představuje nejúčinnější antibiotikum skupiny linkosamidů.



Obr. 4 Struktura linkomycinu



Obr. 5 Struktura klindamycinu

Biologická aktivita

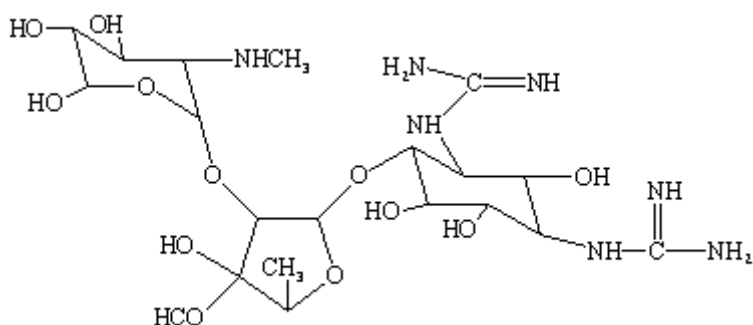
Linkosamidová antibiotika se vyznačují neobvyklým antimikrobiálním spektrem působení. Jsou efektivní proti mnoha G⁺ a neefektivní proti G⁻ aerobním bakteriím, jsou však široce a silně efektivní proti *Bacteroides* a jiným anaerobům. Klindamycin má, jako jedno z mála antibiotik, antimalarické účinky. Tato antibiotika jsou málo toxická.

Chemická analýza

Linkosamidy lze stanovit pomocí GC, např. stanovení reziduí linkomycinu v tkáních lososa³¹. Pomocí reverzní HPLC s UV detekcí byl stanoven linkomycin v mléce a tkáních³², krmivech³³, farmaceutických preparátech³⁴ a kultivačním médiu³⁵. Stejnou technikou byl analyzován klindamycin v léčivu³⁶. Linkosamidy lze také detekovat elektrochemicky, např. při analýze směsi linkomycinu a spektinomycinu³⁷. MS detekce byla využita např. u stanovení linkomycinu v mléce^{38,39}, svalech⁴⁰ a medu⁴¹.

1.1.4.5 Aminoglykosidy

Nejznámějším zástupcem aminoglykosidových antibiotik je streptomycin (Obr. 6), který byl objeven roku 1944. Jedná se o látky tvořené 2 až 4 (amino)sacharidy, resp. (amino)cyklitoly. Aminoglykosidy se dělí na 3 základní skupiny, a to na aminosacharidy obsahující diaminocyklitolstreptamin a jeho deriváty (př. streptomycin, neomycin, kanamycin), aminoglykosidy obsahující cyklitoly a monoaminocyklitoly (kasugamyciny, myomyciny, validomyciny) a necyklitolové aminoglykosidy (monosacharidy, trehalosaminy, sorbistiny).



Obr. 6 Struktura streptomycinu

Biologická aktivita

Aminoglykosidy působí převážně proti G⁻ bakteriím, aktivita vůči G⁺ bakteriím není významná. Streptomycin patří k nejpoužívanějším antibiotikům proti *Mycobacterium tuberculosis*. Gentamicin se vyznačuje vysokou aktivitu proti *Enterobacteriaceae* a proti *Pseudomonas aeruginosa*. Negativní vlastností aminoglykosidů je jejich vyšší toxicita vůči živočišným buňkám.

Chemická analýza

Chemická literatura popisuje např. stanovení kanamycinu, amikacinu a tobramycinu v mléce metodou CZE s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizaci⁴². Fluorescence ve spojení s metodou HPLC, byla využita k analýze tobramycinu v moči⁴³, kanamycinu v krmivech⁴⁴, gentamicinu a neomycinu v živočišné tkáni⁴⁵. Pomocí HPLC s MS detekcí byl stanoven neomycin v lidském a králičím séru⁴⁶, gentamicin v tkáních, buněčném materiálu a léčivech⁴⁷, streptomycin a další aminoglykosidy v ledvinách skotu⁴⁸. Aminoglykosidy v tkáních skotu byly detekovány pomocí MS i pulsní amperometrické detekce⁴⁹.

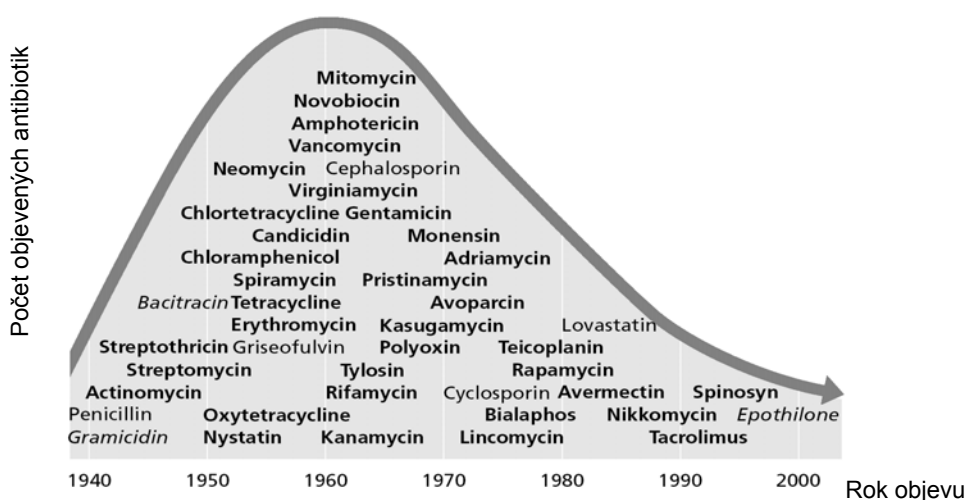
1.1.5 Rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům

Rezistence mikroorganismů je definována jako schopnost odolávat účinku antimikrobiální látky. Rezistence může být primární (daná původní genetickou výbavou mikroorganismu) nebo sekundární tzv. získaná (vzniká jako důsledek mutací nebo různých genetických přenosů), která je nejčastějším typem rezistence⁵⁰.

V souvislosti s nesprávným používáním současných antibiotik dochází ke vzniku sekundární rezistence některých patogenů vůči nim⁵¹. Hledání nových antibiotik v přírodním prostředí představuje jednu z možností, jak tento vážný problém řešit.

1.1.6 Objev a vývoj nových antibiotik

Éru antibiotik zahájil objev penicilinu v roce 1929 Alexandrem Flemingem. Trvalo však více než deset let, než byla zvládnuta jeho příprava v technologickém měřítku. Ve 40. a 50. letech byly učiněny další zásadní objevy v této oblasti. V roce 1944 byl objeven streptomycin, roku 1945 bacitracin, významným se stal roku 1947 chloramfenikol a o rok později chlortetracyklin. V roce 1952 erytromycin a mnoho dalších. Nejvíce antibiotik se objevilo přibližně mezi lety 1955 – 1965 (Obr. 7). Mezi přípravky registrované kolem roku 2006 patří tigecyklin (Tygacil), daptomycin (Cubicin), semisyntetické glykopeptidy (Oritavancin, Televancin a Dalbavancin) nebo ramoplanin⁵².



Obr. 7 Objev nových antibiotik (převzato z⁵³)

V poslední době se objev nových antibiotik výrazně zpomalil. Obvykle se nacházejí již známé látky. Přesto se předpokládá, že většina antibiotik produkovaných například aktinomycetami z rodu *Streptomyces* nebyla dodnes objevena⁴. Jedná se však o kmeny, které se vyskytují velmi vzácně⁵⁴. V současné době jsou antibiotika hledána především u mikroorganismů izolovaných z neobvyklých lokalit (tropické lesy, dna jezer a moří s extrémními koncentracemi solí, horké prameny, půdy s extrémním pH), kde lze předpokládat přítomnost vzácných a dosud nezkoumaných mikroorganismů^{55,56,57}.

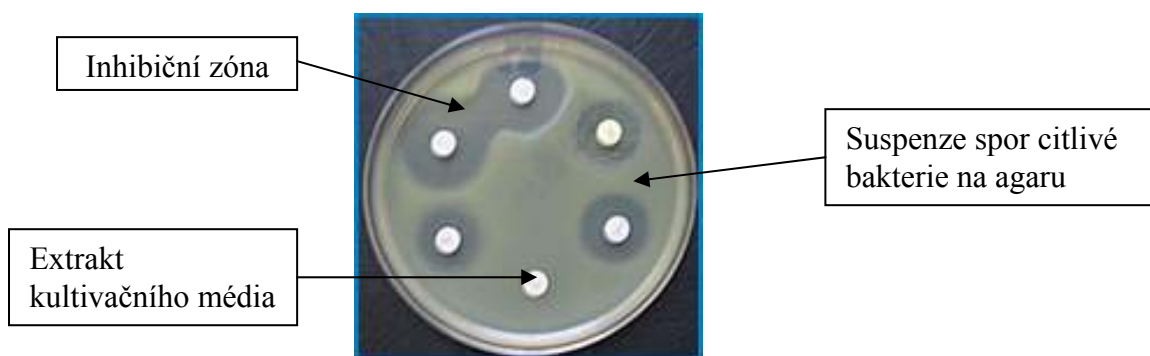
K objevu nových antibiotik existuje také řada dalších přístupů. Například lze využít DNA izolovanou ze vzorků prostředí (zejména půdy a vody), která se po zpracování a klonování kultivuje v recipientech. Dále se provádí chemická modifikace a biotransformace již známých antibiotik nebo se hledají nová zásahová místa v patogenních mikroorganismech. Aplikace moderních instrumentálních metod analytické chemie je nezbytnou součástí mnoha postupů vedoucích k objevu nových antibiotik⁵⁷.

1.2 TESTOVÁNÍ BIOLOGICKÉ AKTIVITY

1.2.1 Druhy testů biologické aktivity

1.2.1.1 Diskový difúzní test (Kirby-Bauer test)

Postup pro stanovení účinnosti antibiotik proti patogenním mikrobům. Na Petriho misky s agarovou půdou se rozprostře vrstva citlivého organismu, nejčastěji G+ nebo G- bakterie. Na tuto vrstvu se umístí disky z filtračního papíru nasycené testovaným vzorkem. Pokud vzorek obsahuje antibiotikum, na které není citlivý kmen rezistentní, vytvoří se během kultivace okolo disku inhibiční zóna. Průměr této zóny závisí na citlivosti bakterie na antibiotikum a na jeho koncentraci. Na následujícím Obr. 8 je znázorněna citlivost bakterie na antibiotikum.



Obr. 8 Znárodnění citlivosti bakterie na antibiotikum (Diskový difúzní test)

1.2.1.2 E-test

Tento test využívá papírový pásek s gradientem antibiotika na jedné straně a měřítkem na straně druhé. Místo, kde inhibiční zóna přetíná měřítko určuje minimální inhibiční koncentraci (MIC), což je minimální koncentrace antibiotika, která ještě inhibuje bakteriální kulturu (Obr. 9).



Obr. 9 Znárodnění citlivosti bakterie na antibiotikum (E-test)

1.2.1.3 Zřed'ovací zkumavkový test

Tekutý vzorek se naředí pomocí koncentrační ředící řady a koncentrace antibiotika se pak stanoví na pevném médiu (diskový difúzní test) nebo pomocí jiných analytických metod. Při stanovení růstu bakteriální kultury v tekutém médiu s antibiotikem se používají hlavně turbidimetrické metody.

1.2.2 Mikroorganismy používané pro testy biologické aktivity

Účinek antibiotik vůči různým mikroorganismům je velmi odlišný a je závislý především na složení buněčné stěny. Proto se k testování biologické aktivity nejčastěji používají grampozitivní (G+) i gramnegativní (G-) bakterie, které mají vzájemně rozdílnou stavbu buněčné stěny.

Jako grampozitivní se označují bakterie, které mají na konci diagnostického barvení podle Gramovy metody⁵⁸ pod mikroskopem modrofialovou barvu. To je zapříčiněno vysokým obsahem peptidoglykanu v buněčné stěně a absencí vnější membrány a lipopolysacharidové vrstvy. Mezi G+ bakterie používané k testování biologické aktivity patří *Kocuria rhizophila*.

Gramnegativní bakterie mají buněčnou stěnu složenou z vnější třívrstevné membrány (proteiny, lipopolysacharidy, lipoproteiny) a vnitřní tenké a pevné peptidoglykanové vrstvy. Následkem toho vycházejí tyto bakterie z Gramova barvení jako růžové. Nejpoužívanější G- bakterií k testování biologické aktivity je *Escherichia coli*.

1.3 EXTRAKCE KULTIVAČNÍHO MÉDIA

Kultivační médium je velice složitá matrice, proto musí samotné chromatografické analýze biologicky aktivních látek předcházet čistící a s tím spojený prekoncentrační krok. Zabrání nebo omezí se tím ucpávání chromatografické kolony, interferencím s látkami pocházejícími z matrice a v neposlední řadě se mnohonásobně zvýší citlivost analýzy. Nejběžnějšími technikami úpravy vzorků z matrice jsou extrakce kapaliny kapalinou (LLE, z angl. "liquid-liquid extraction") nebo v dnešní době velmi rozšířenou technikou extrakce na pevné fázi (SPE, z angl. "solid phase extraction")⁵⁹.

1.3.1 Extrakce kapalina – kapalina

Principem metody LLE je distribuce analytů a interferentů mezi dvě navzájem nemísitelné kapaliny, ve většině případů se jedná o vodný vzorek vs. organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou. Analyty se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé

rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení.

Mezi výhody této metody patří jednoduchost a možnost extrakce širokého spektra látek volbou různých rozpouštědel. Ty jsou ale ve většině případů toxická. Nevýhodou je nutnost zbavit se nadbytku organického rozpouštědla.

1.3.2 Extrakce na pevné fázi

SPE je technika přípravy vzorků, ve které se analyt sorbuje na tuhou fázi z fáze kapalnou. Interakce analytu s tuhou fází musí být silnější než s fází kapalnou, ve které je analyt rozpuštěn. Při použití SPE se lze vyhnout řadě problémů, které jsou již tradičně spojovány s LLE, např. emulgování směsi a špatné rozdělení fází. Největšími výhodami SPE oproti LLE ovšem jsou větší výtěžnost, lepší reprodukovatelnost a v neposlední řadě snížení spotřeby organických rozpouštědel.

SPE je nejčastěji používána při zpracování vzorků ve vodné fázi, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek. Současně dojde k jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích látek, rušících následná analytická stanovení⁶⁰.

Nejdůležitějším krokem je volba správného sorbentu. Mechanismus retence v SPE je stejný jako v kapalinové chromatografii, a proto i používané sorbenty jsou velice podobné⁵². Používají se chemicky vázané obrácené fáze na bázi silikagelu, normální fáze a iontově výměnné fáze aj. V současné době se začínají rozvíjet i sorbenty, které nejsou na bázi silikagelu, např. sorbent HLB (z angl. "hydrophilic-lipophilic-balanced"). Mezi největší výhody tohoto sorbentu patří vysoká pH stabilita, velmi dobrá retence polárních i nepolárních látek a minimální vliv vysušení sorbentu na reprodukovatelnost.

Sorbenty jsou uloženy v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla (Obr. 10) a nebo slisovány se skleněnými vlákny do disků.



Obr. 10 SPE kolonky se sorbetem (převzato z ⁶¹)

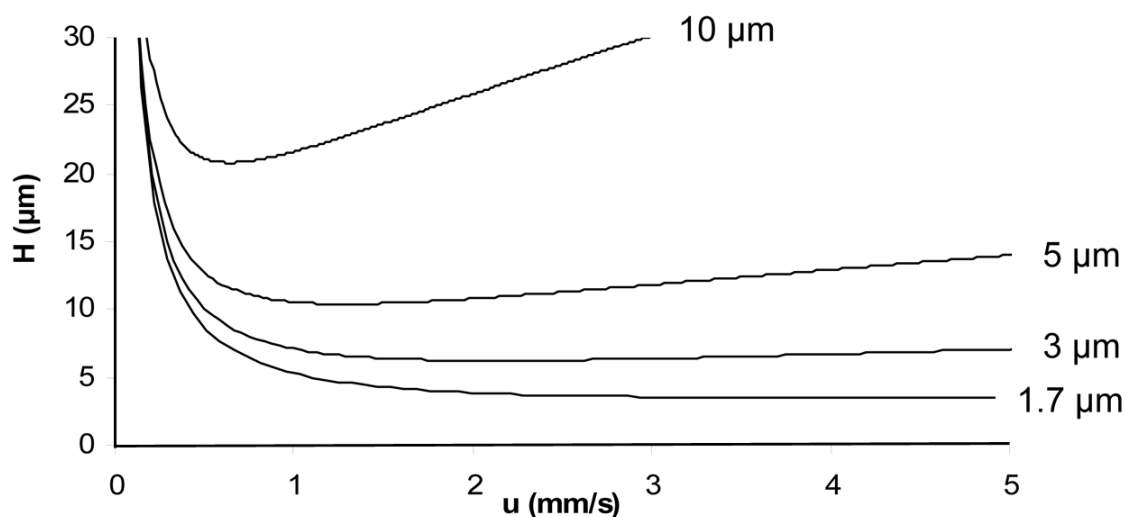
1.4 INSTRUMENTÁLNÍ METODY

Biologický vzorek představuje i po přečištění pomocí SPE složitou směs mnoha látek, proto je nutné k chemické analýze využít některou ze separačních metod. V principu jde o metody, které spočívají na principu rozdílné distribuce dělených látek mezi dvě různé nemísitelné fáze. Největší význam mají v současné době zejména chromatografické metody. Plynovou chromatografií lze analyzovat plynné vzorky, kapalně vzorky převedené na těkavé sloučeniny a tuhé vzorky rozpuštěné ve vhodném rozpouštědle. Kapalinová chromatografie (HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie) je vhodná pro celou řadu vzorků: ionty, polární i nepolární látky, málo těkavé, tepelně nestabilní i vysokomolekulární látky. Dále jsou využívány elektromigrační separační metody, např. kapilární zónová elektroforéza pro separace a stanovení molekul anorganických a organických látek nesoucí kladný nebo záporný náboj.

Nezbytnou součástí instrumentace jsou detektory, mezi nejběžnější patří UV detektor pro látky absorbující v UV oblasti. Pro látky, které vykazují fluorescenci, se používá fluorescenční detektor, jehož výhodou je vysoká citlivost. Pokud mohou být analyty redukovány nebo oxidovány, lze využít detektor elektrochemický. Refraktometrický detektor je založený na měření rozdílu indexů lomu, ale pro svou poměrně malou citlivost není v praxi využíván příliš často. Nachází uplatnění zejména pro detekci cukrů. V současné době je velmi často využíván hmotnostní detektor (viz kapitola 1.4.2).

1.4.1 Ultra účinná kapalinová chromatografie

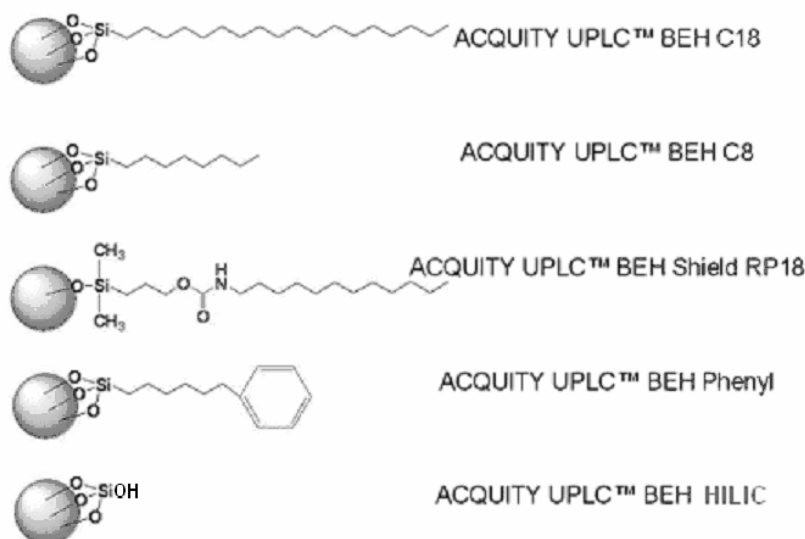
UPLC (z angl. "Ultra Performance Liquid Chromatography") je novou separační technikou založenou na principech HPLC, ale využívající menší částice sorbentu. Velikost částic v UPLC kolonách je 1,7 μm . Jak vyplývá z Van Deemterovy křivky (Obr. 11), při použití takto malých částic sorbentu lze pracovat v daleko větším rozsahu lineárních rychlostí (na rozdíl od standardních částic o průměru 3 nebo 5 μm) za několikanásobně vyšší účinnosti (menší výškový ekvivalent teoretického patra). Použití těchto částic způsobuje podstatné zvýšení zpětného tlaku (až 15 000 psi), čemuž je přizpůsobena nová instrumentace. Oproti klasické HPLC technice se u UPLC zvýšila citlivost, čímž došlo ke snížení mezí detekce. Další výhodou UPLC je podstatné zkrácení doby analýzy, což vede ke snížení nákladů (menší spotřeba rozpouštědel).⁶²



Obr. 11 Van Deemterovy křivky – závislost výškového ekvivalentu teoretického patra na lineární rychlosti pro částice sorbentu různých velikostí (převzato z ⁶³)

Separací proces klasických UPLC kolon využívá sorbentů připravených technologií BEH (z ang. "bridged hybrid particle"), které vykazují vysokou mechanickou a chemickou odolnost a velmi dobrou separační účinnost. Tato vlastnost je způsobena propojením volných hydroxylových skupin silikagelu ethylenovými můstky. Takto připravené sorbenty odolávají velkému rozmezí pH a kolony lze tedy použít v oblasti pH 2 až 12. Pro UPLC kolony je v současné době k dispozici 5 druhů stacionárních fází

s různým navázaným ligandem: C18 a C8, Shield RP18 (C18 se zabudovanou polární karbamátovou skupinou), Phenyl a HILIC. Na Obr. 12 jsou stacionární fáze znázorněné. Každá stacionární fáze poskytuje rozdílné kombinace hydrofobicity, silanolové aktivity, hydrolytické stability a chemické interakce s analytem.



Obr. 12 UPLC kolony (převzato z ⁶⁴)

V současné době je pro UPLC komerčně dostupná řada běžných detektorů, jako jsou spektrofotometrický PDA detektor (z angl. Photo Diode Array detector), fluorescenční detektor a několik druhů hmotnostních spektrometrů.

1.4.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, která určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty. Hmotnostní spektrometr separuje nabitě částice podle jejich efektivní hmotnosti m/z . Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum, kde je na vodorovné ose vynesena hodnota m/z a svislá osa představuje odezvu detektoru. Podoba hmotnostního spektra závisí na použité instrumentaci.

Nejdůležitějšími částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj a hmotnostní analyzátor. Iontový zdroj převádí analyzované látky do ionizovaného stavu. Lze využít buď tvrdou ionizaci (např. elektronová ionizace), při které dojde k rozsáhlé fragmentaci

molekuly nebo měkkou ionizaci (např. MALDI – z angl. "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization"), při které nedochází k tak rozsáhlé fragmentaci a v MS spektru převládá molekulový pík. Vzniklou směs iontů rozděljuje na základě různých m/z hmotnostní analyzátor. Mezi používané hmotnostní analyzátory patří např. magnetický, kvadrupólový, iontová past a průletový analyzátor (TOF – z angl. "Time of Flight").

Hmotnostní spektrometrie se využívá především pro určení nebo potvrzení struktury chemických látek. Ve spojení s chromatografickými metodami lze hmotnostní spektrometr využít jako detektor a to především ke stopové analýze organických látek.

1.5 CÍL PRÁCE

1. Analyzovat a izolovat sekundární metabolity v kultivačním médiu vybraných aktinomycet.
2. Izolované sekundární metabolity otestovat na biologickou aktivitu pomocí citlivého kmene *Kocuria rhizophila*.
3. Biologicky aktivní sekundární metabolity izolovat pro MS analýzu.
4. Na základě MS analýzy částečně identifikovat neznámé biologicky aktivní látky, které by mohly být potenciálně novými antibiotiky.

1.6 VÝBĚR POUŽITÝCH METOD

Jak vyplývá z vlastností jednotlivých skupin antibiotik produkovaných aktinomycetami (kap. 1.1.4), je pro separaci všech popisovaných analytů od matrice nejčastěji využívána HPLC. Vzhledem k výhodám UPLC oproti HPLC (kap 1.4.1) lze usuzovat, že je aplikace UPLC pro analýzu potenciálních antibiotik v kultivačním médiu vhodná. Všechna antibiotika popisovaná v kap. 1.1.4 lze s výjimkou aminoglykosidů detekovat UV detektorem. Testování biologické aktivity pomocí G+ bakterie *Kocuria rhizophila* umožní detekovat většinu antibiotik produkovaných aktinomycetami. Výjimkou jsou opět aminoglykosidy, u kterých negativní výsledek vyřadí vzorek z dalších experimentů, což je ovšem výhodou, protože aminoglykosidy nemůžeme vzhledem k použité instrumentaci analyzovat.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 CHEMIKÁLIE

Voda, HPLC grade, připravená pomocí reverzní osmózy na Direkt-Q 3 UV (Millipore, USA)

Methanol, LC/MS grade (Merck, Německo)

Acetonitril, LC/MS grade (T. J. Baker, Nizozemí)

Kyselina octová, 99 % (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydroxid amonný, 29 % A. C. S. reagent (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina trifluoroctová, 99.95 % ULC/MS grade (Biosolve, Nizozemí)

YEME médium: kvasniční extrakt (OXOID, Anglie), pepton (Chemos, Česká republika), sladový extrakt (OXOID, Anglie), glukóza (Sigma-Aldrich, Německo), $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich, Německo).

AVM médium: kvasniční extrakt (OXOID, Anglie), $(NH_4)_2SO_4$ (Sigma-Aldrich, Německo), $CaCO_3$ (Sigma-Aldrich, Německo), NaCl (Sigma-Aldrich, Německo), K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Německo), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich, Německo), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich, Německo), $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich, Německo), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma-Aldrich, Německo), glukóza (Sigma-Aldrich, Německo).

B1 agarová půda: hovězí extrakt (OXOID, Anglie), pepton (Chemos, Česká republika), NaCl (Sigma-Aldrich, Německo), agar (OXOID, Anglie), destilovaná H_2O).

2.2 KULTIVACE AKTINOMYCET

Spory aktinomycet pocházející ze sbírky Mikrobiologického ústavu AV ČR, byly naočkovány do 50 ml YEME média (kvasniční extrakt 3 g l^{-1} , pepton 5 g l^{-1} , sladový extrakt 3 g l^{-1} , pH 7,2; po sterilizaci přidán 1 ml 50 % glukózy a $100 \mu\text{l}$ $2,5 \text{ mol l}^{-1}$ $MgCl_2$ a kultivovány 30 h při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (očkovací kultura). Médium AVM (25 ml), které obsahovalo kvasniční extrakt 2 g l^{-1} , $(NH_4)_2SO_4$ 2 g l^{-1} , $CaCO_3$ 5 g l^{-1} , NaCl 2 g l^{-1} , K_2HPO_4 $0,5 \text{ g l}^{-1}$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,05 \text{ g l}^{-1}$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,05 \text{ g l}^{-1}$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,05 \text{ g l}^{-1}$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ $0,1 \text{ g l}^{-1}$, glukóza 5 g l^{-1} , bylo naočkováno 5 %

očkovací kultury a bylo kultivováno 120 h při 30 °C. Kultivace byla centrifugována (4000 rpm, 4 °C, 10 min) a supernatant byl použit pro další experimenty.

2.3 EXTRAKCE NA PEVNÉ FÁZI

Supernatant kultivačního média byl přečištěn a prekoncentrován pomocí kolonek HLB 60 mg (Waters) následujícím postupem:

- kondicionace: 3 ml methanolu
- ekvilibrace: 3 ml vody
- vzorek: 3 ml kultivačního média
- promytí: 3 ml vody
- eluce: 1 ml methanolu

Extrakce byla provedena čtyřikrát, celkem tedy bylo extrahováno 12 ml kultivačního média. Eluent byl odpařen a rozpuštěn ve 400 µl methanolu. Výsledný extrakt byl tedy 30 krát prekoncentrován. Takto získaný extrakt byl testován na biologickou aktivitu, analyzován UPLC metodou a popřípadě z něj byla preparována vytipovaná biologicky aktivní látka.

2.4 TESTY BIOLOGICKÉ AKTIVITY

Biologická aktivita byla testována pomocí diskového difúzního testu (Kirby-Bauer test). Na kultivační misky s agarovou půdou B1 (hovězí extrakt 10 g l⁻¹, pepton 10 g l⁻¹, NaCl 5 g l⁻¹, agar 20 g l⁻¹, destilovaná H₂O, pH 7,2) byla rozprostřena suspenze spor citlivé bakterie *Kocuria rhizophila* CCM 552. Na vrstvu citlivého kmene byly umístěny disky z filtračního papíru nasycené 15 µl SPE extraktu nebo UPLC frakce. Takto připravené misky s citlivým kmenem byly kultivovány 24 h při 30 °C. V případě přítomnosti biologicky aktivních látek v testovaném vzorku se kolem disku vytvořily zóny inhibice růstu citlivého kmene indikující přítomnost bioaktivní látky ve vzorku.

2.5 ULTRA ÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

2.5.1 UPLC analýza

Extrakty kultivačního média byly analyzovány pomocí UPLC spojené s PDA detektorem (Waters, USA). 5 µl extraktu bylo dávkováno na kolonu BEH C18 (Waters, USA) a eluováno průtokovou rychlostí 0,4 ml min⁻¹ v módu lineárního gradientu (min/% acetonitrilu): 0/5; 7/27; 12/33; 17/88; 18/100; 20/100 s následnou 2 min ekvilibrací před další analýzou (celková doba analýzy tedy činila 22 min). Pro jednotlivé extrakty byly testovány dvě mobilní fáze o různém pH: (A) 10 mmol l⁻¹ NH₄COOH o pH 9,0 a acetonitril a (B) 0,1% vodný roztok TFA a acetonitril. Pro další práci byla vybrána ta, která byla vhodnější pro daný extrakt. Chromatografická kolona byla udržována při 30 °C. K UV detekci byl použit široký rozsah vlnových délek 194 – 600 nm a MAX PLOT. Data byla zpracována pomocí počítačového programu Empower 2 (Waters, USA).

2.5.2 UPLC preparace

200 µl extraktu bylo postupně preparováno (40 preparací po 5 µl) pomocí UPLC metody (viz odst. 2.5.1) za účelem izolace jednotlivých látek. Frakce byly odpařeny do sucha a rozpuštěny ve 200 µl methanolu. 5µl bylo následně analyzováno na UPLC ke kontrole čistoty jednotlivých frakcí a 15 µl každé frakce bylo použito k testu biologické aktivity (viz odst. 2.4). Frakce, u kterých byla prokázána přítomnost biologicky aktivních látek, byly podruhé preparovány, aby byla v jednotlivých frakcích získána co nejčistší látka. Zbylých 180 µl biologicky aktivní frakce bylo prekoncentrováno na 30 µl a byly provedeny již jen čtyři UPLC preparace a to proto, aby nebyl ve frakci po druhé preparaci zakoncentrovaný pufr z mobilní fáze, který by mohl způsobit nežádoucí interference během MS analýzy. Frakce po druhé preparaci byly odpařeny do sucha a podrobeny analýze na hmotnostním spektrometru.

2.6 EXPERIMENTÁLNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

MS analýza byla provedena RNDr. M. Šulcem Ph.D. z Laboratoře charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR, v. v. i.

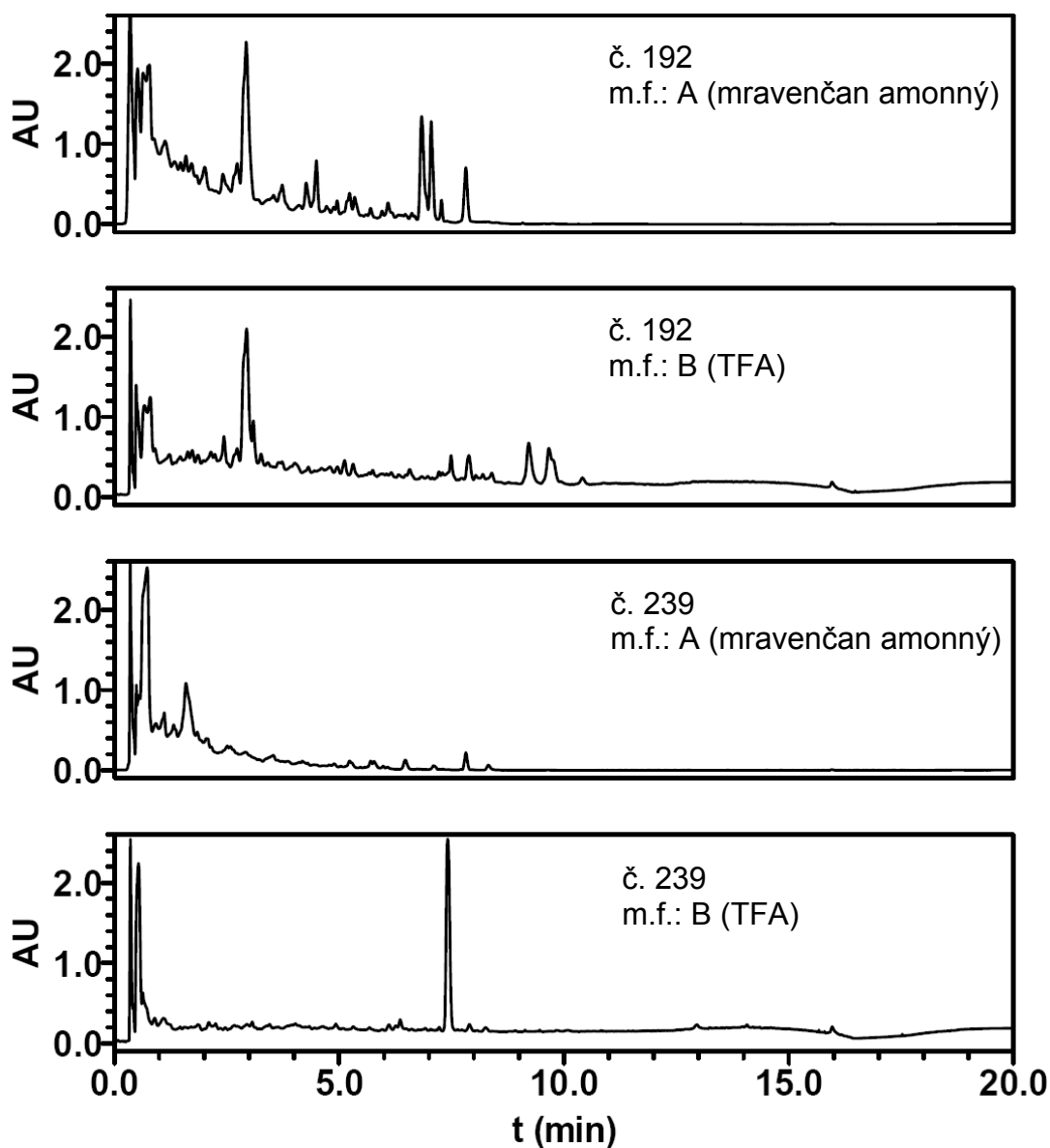
Hmotnostní spektra byla měřena na MALDI-TOF/TOF (z angl. "matrix-assisted laser desorption/ionisation reflectron time-of-flight") hmotnostním spektrometru ULTRAFLEX III (Bruker-Daltonics, Brémy, Německo) s ionizací/desorpcí laserem za pomoci matrice. Externí kalibrace hmotnostních spekter v pozitivním modu byla provedena na monoizotopické signály $[M + H]^+$ lidského angiotenzinu I $m/z = 1296,69$, peptidu MRFA $m/z = 524,26$ a matrice alfa-kyanoskořicové kyseliny $m/z = 379,09$. Jako MALDI matrice byla použita buď kyselina ferulová (FA) nebo kyselina alfa-kyanoskořicová (CCA) o koncentraci 10 mg ml^{-1} v roztoku 50 % acetonitrilu a 0.3 % kyseliny octové. $1 \mu\text{l}$ roztoku matrice byl smíchán s $0,5 \mu\text{l}$ methanolického roztoku vzorku a $1 \mu\text{l}$ takto připraveného vzorku byl nanesen na terč. Po odpaření kapičky při pokojové teplotě do sucha byla pozitivní MALDI-TOF spektra a fragmentační dceřiná spektra prekurzorů (PSD, z angl. "post source decay") sbírána v reflektroновém režimu. Experimenty tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) byly provedeny na hmotnostním spektrometru LCQ^{DECA} (ThermoQuest, San Jose, USA) vybaveným iontovou pastí a statickým nanoelektrosprejem. Napětí spreje bylo nastaveno na 1,2 kV, napětí vstupní čočky na 30 V a vyhřívána kapilára byla udržována na teplotě 175 °C a napětím 10 V. Pozitivní hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu $m/z = 150-2000$. MS/MS experimenty kolizně indukované disociace (CID, z angl. "collision-induced dissociation") byly provedeny z nejméně intenzivních iontů při nastavení srážkové energie v rozmezí 25-40 jednotek s aktivačním časem 30 ms.

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 UPLC ANALÝZA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ A IZOLACE BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

SPE extrakty kultivačních médií aktinomycet č. 192 a 239, u kterých prokázal test biologické aktivity přítomnost biologicky aktivních látek, byly analyzovány metodou UPLC za použití dvou různých mobilních fází. Z chromatogramů na obr. 14 je patrné, že pro UPLC analýzu a preparaci extraktu kultivačního média č. 192 je vhodnější mobilní fáze 10 mmol l⁻¹ NH₄COOH o pH 9 (mobilní fáze A). Naopak, v případě extraktu

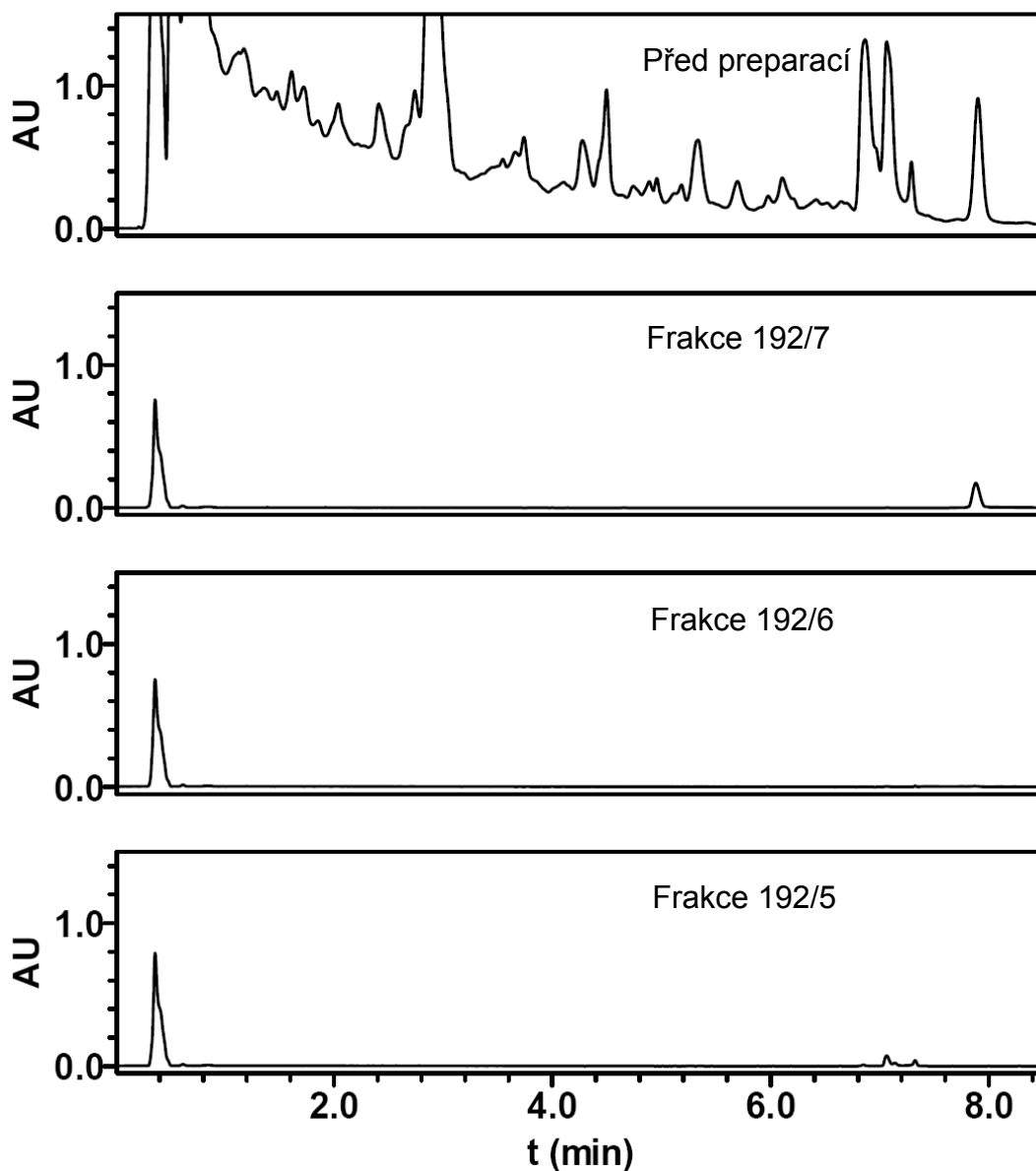
č. 239 je nutné použít kyselou mobilní fázi, tedy 0,1 % TFA (mobilní fáze B).



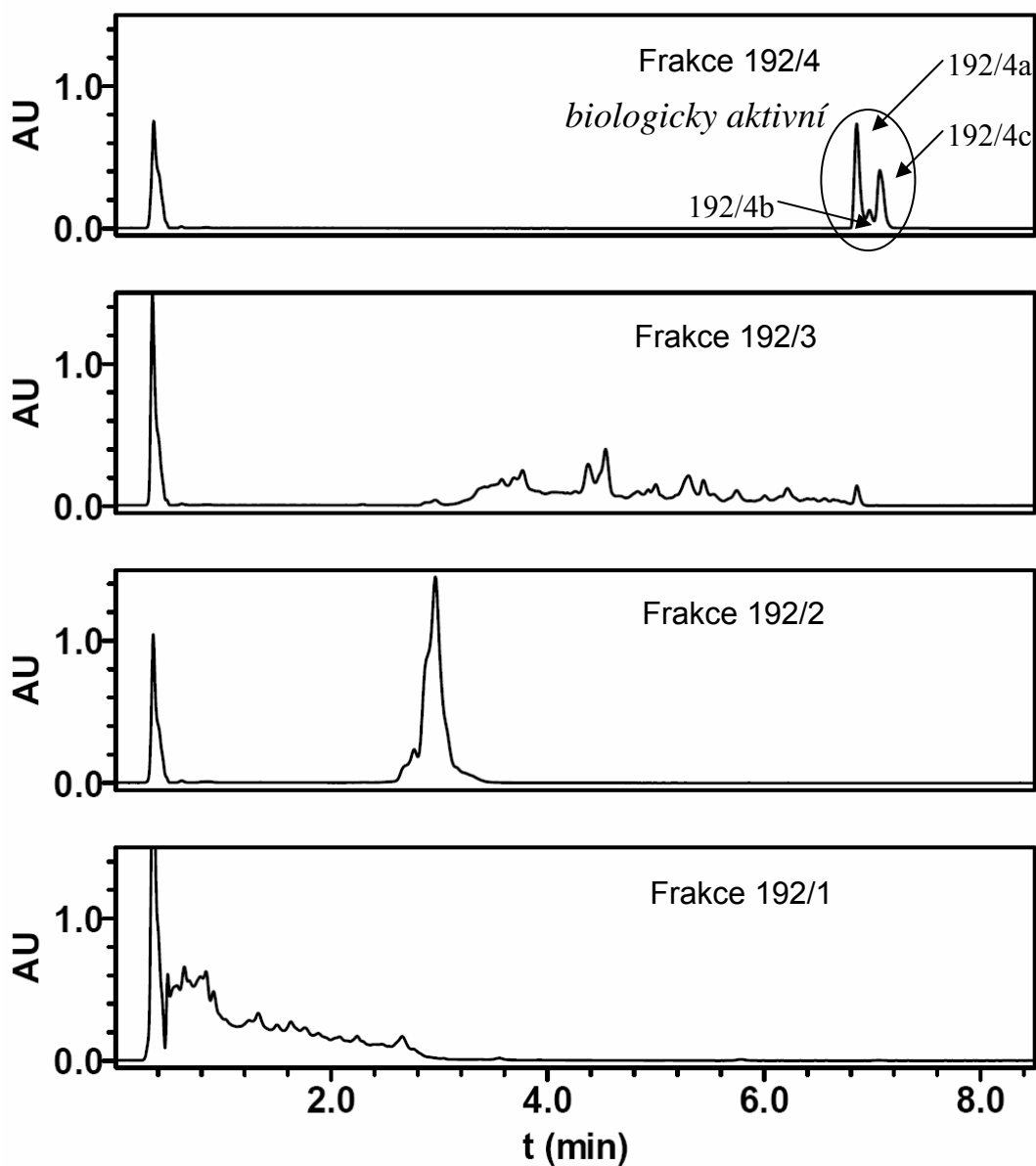
Obr. 13 Chromatogram SPE extraktů kultivačních médií č. 192 a 239 s použitím různých mobilních fází. Chromatografické podmínky: Dávkovaný objem 5 μl ; chromatografická kolona Acquity BEH C18 (Waters); průtoková rychlost 0,4 ml min^{-1} ; lineární gradient (min/% acetonitrilu): 0/5; 7/27; 12/33; 17/88; 18/100; 20/100 s následnou 2 min ekvilibrací před další analýzou; mobilní fáze: A/ 10 mmol l^{-1} NH_4COOH o pH 9,0 a acetonitril a B/ 0,1% vodný roztok TFA a acetonitril. Detekce: UV, Max Plot (maximální UV absorpce v daném čase).

Jednotlivé látky (frakce) ze vzorků č. 192 a 239 byly izolovány preparací pomocí UPLC. Na Obr. 14a a 14b jsou znázorněny analýzy izolovaných sedmi frakcí (1-7)

vzorku č. 192. Test biologické aktivity těchto frakcí byl pozitivní v případě frakce 192/4. Jak je vidět z chromatogramu této frakce, jedná se o 2 majoritní a 1 minoritní látku. Pro účely MS analýzy byla frakce opět preparována, aby se získaly čisté látky označené 192/4a, 192/4b, 192/4c a odstranil zkoncentrovaný pufr. Tyto látky byly podrobeny MS analýze.

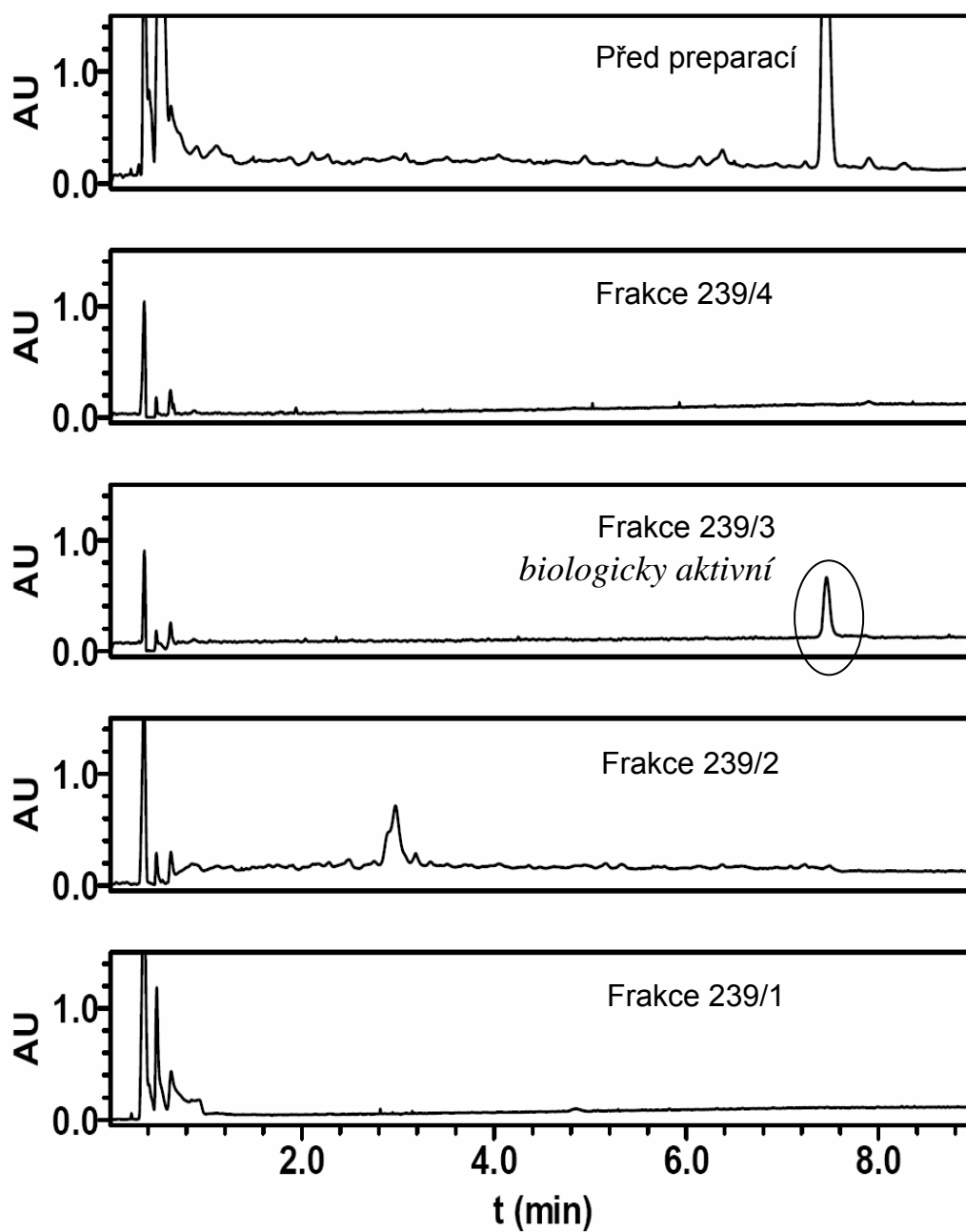


Obr. 14a Extrakt č. 192 a jeho frakce 192/5 - 192/7. Chromatografické podmínky: mobilní fáze - 10 mmol l⁻¹ NH₄COOH o pH 9,0 a acetonitril, další podmínky viz legenda k Obr. 13.



Obr. 14b Extrakt č. 192: frakce 192/1 - 192/4. Chromatografické podmínky: mobilní fáze - 10 mmol l⁻¹ NH₄COOH o pH 9,0 a acetonitril, další podmínky viz legenda k Obr. 13.

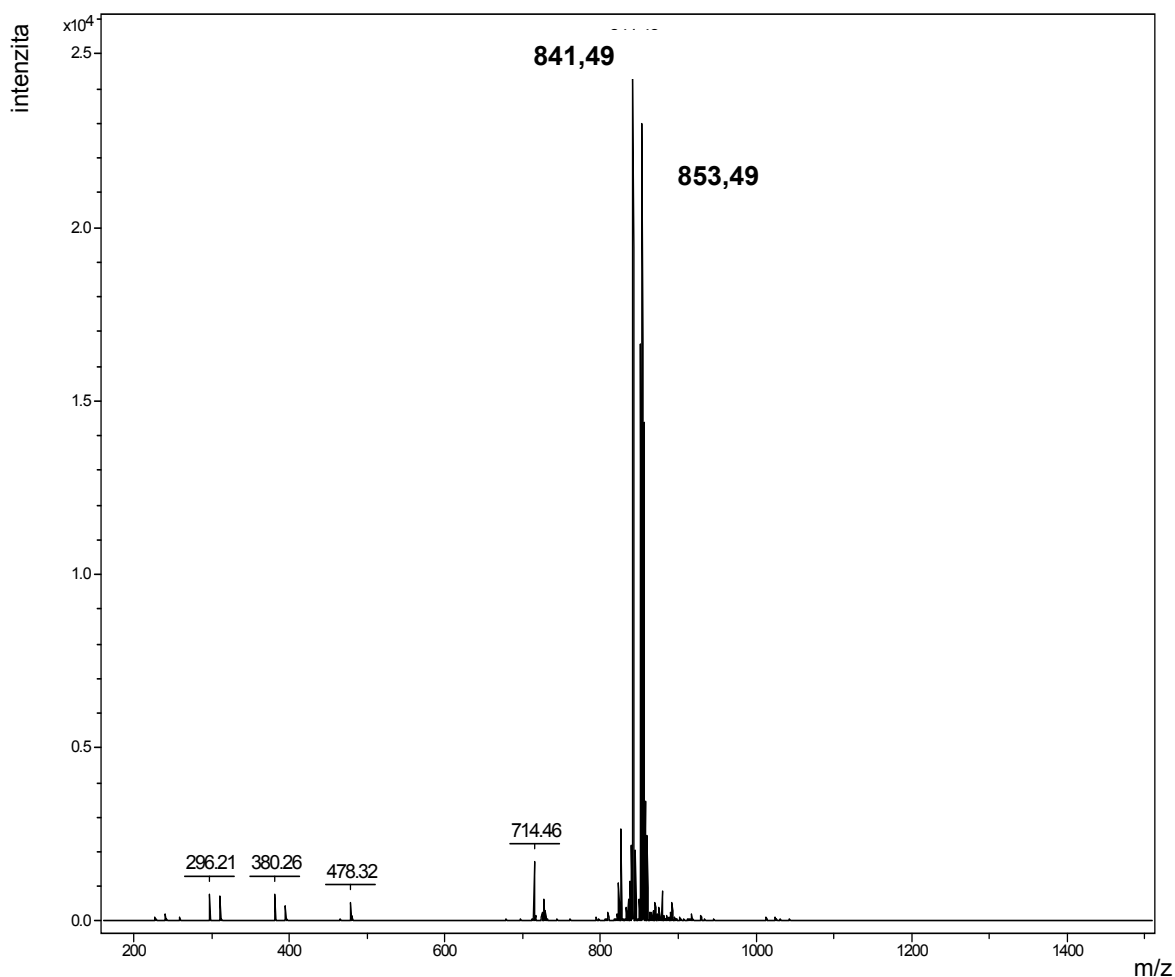
Na následujícím Obr. 15 jsou znázorněny analýzy čtyř izolovaných frakcí vzorku č. 239. Biologická aktivita u tohoto vzorku se projevila pouze u jedné látky – jedna frakce označená. Pro účely MS analýzy byla frakce 239/3 opět preparována, aby se odstranil zkoncentrovaný pufr.



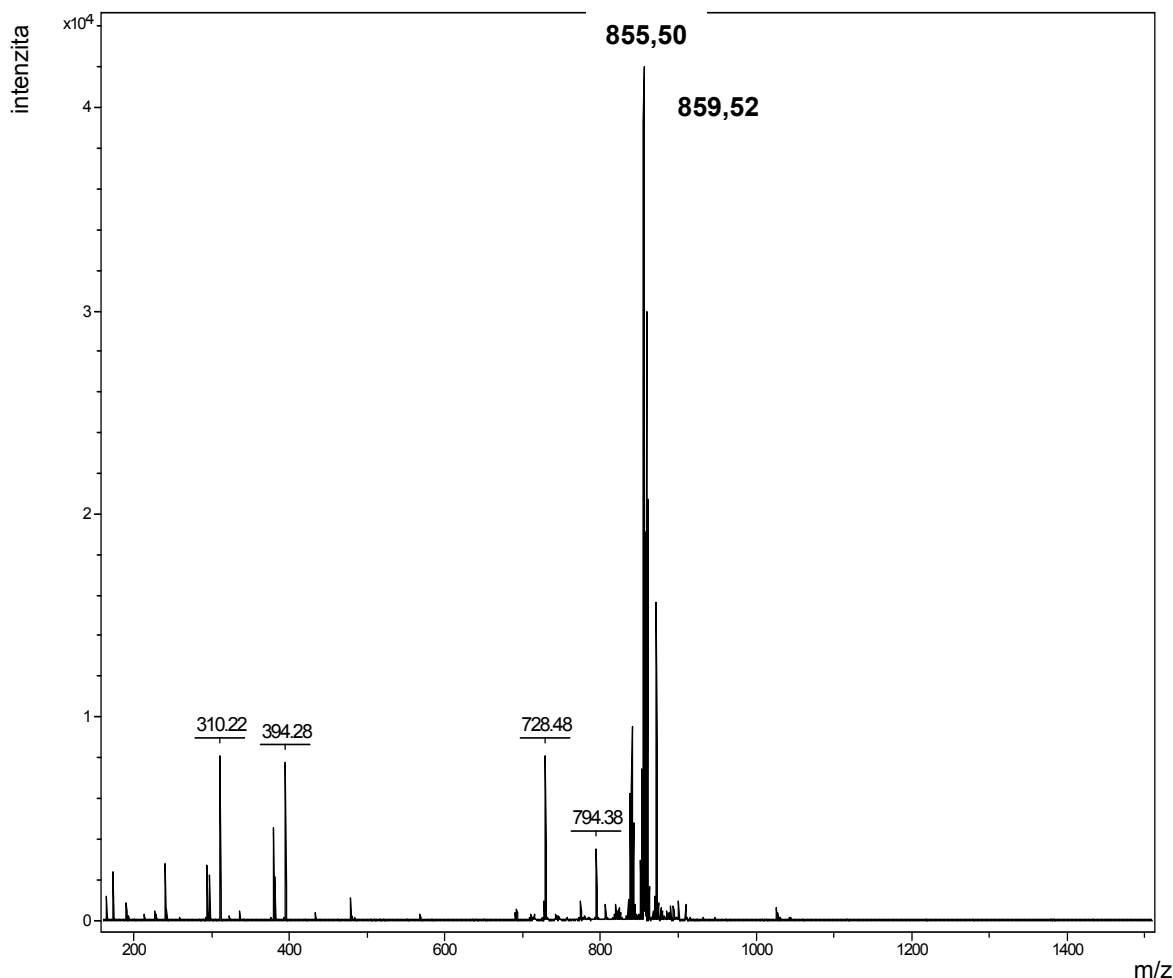
Obr. 15 Extrakt č. 239 a jeho jednotlivé frakce. Chromatografické podmínky: mobilní fáze - 0,1 % vodný roztok TFA a acetonitril, další podmínky viz legenda k Obr. 13.

3.2 MS ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Ze získaných MS spekter jednotlivých frakcí a následných MS/MS experimentů lze odhadnout, které píky odpovídají kvazimolekulárnímu iontu. Z jeho hodnoty m/z je pak možné určit monoizotopickou M_r látky. Ve frakci 192/4a jsou přítomny dvě látky s monoizotopickou M_r 840,49 a 852,49. MS spektrum této frakce je zobrazeno na Obr. 16. Z MS spektra frakce 194/4c (Obr. 17) vyplývá, že jsou v tomto vzorku přítomny také dvě látky, jejichž monoizotopická M_r je 854,50 a 858,52. Ve frakci 192/4b převládá směs látek výše uvedených frakcí, proto nebyla tato frakce dále brána v úvahu.



Obr. 16 MS spektrum vzorku 192/4a. MS podmínky: MALDI-TOF, CCA matrice, pozitivní mód



Obr. 17 MS spektrum vzorku 192/4c. MS podmínky: MALDI-TOF, CCA matrice, pozitivní mód

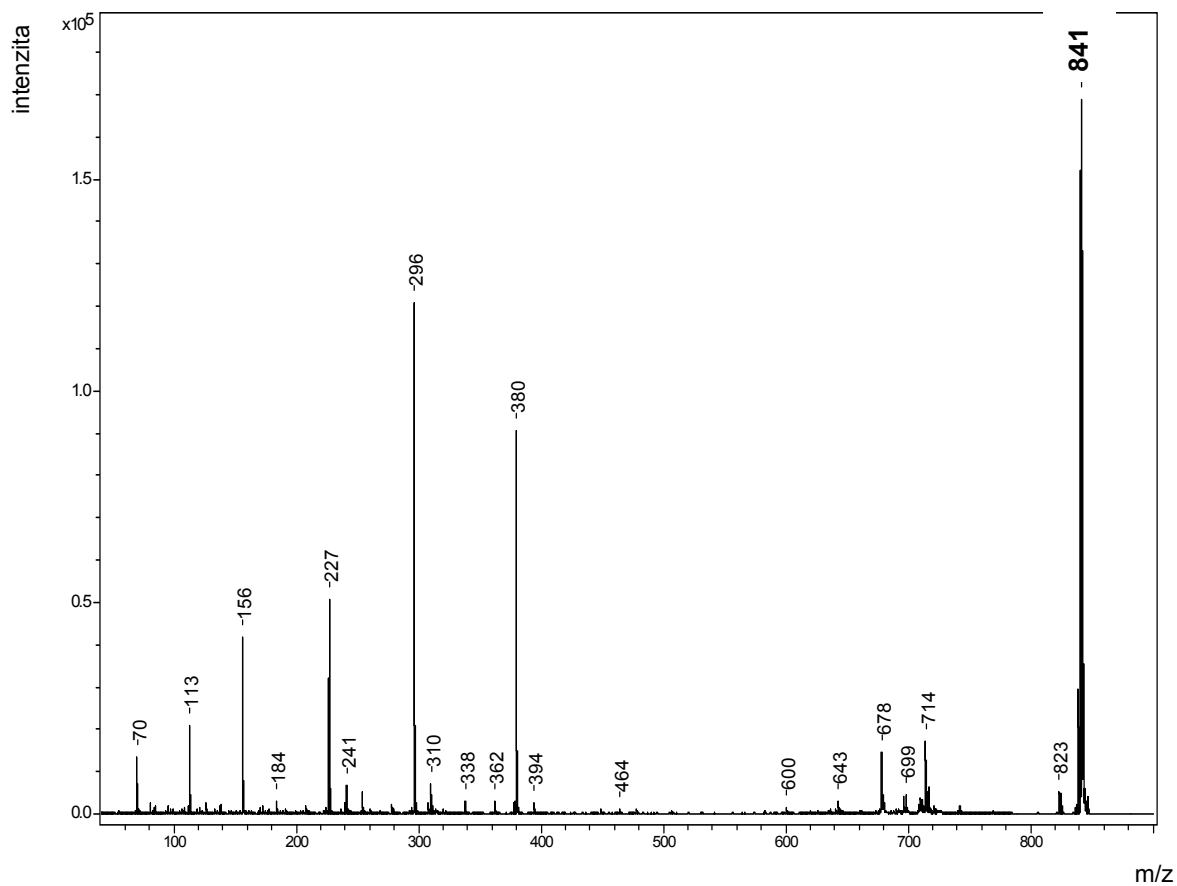
V databázi ChemIDplus Advanced⁶⁵ byla vyhledána antibiotika a přírodní látky s M_r , které po přepočtení na monoizotopickou hodnotu M_r odpovídají experimentálním hodnotám monoizotopické M_r nalezených látek ve frakcích 192/4a a 192/4c s tolerancí $M_r \pm 0,5$. Získané informace jsou uvedeny v Tab. 2. Celkem bylo nalezeno 17 látek, které na základě hodnoty M_r mohou odpovídat neznámým látkám ve frakcích 192/4a a 192/4c. MS/MS spektra neznámých látek ovšem žádné z látek nalezených v databázi neodpovídají. Jako příklad je na Obr. 18 MS/MS spektrum iontu s m/z 841 odpovídající látky s M_r 840,49 z frakce 192/4a. V případě této látky dochází k hlavní ztrátě $m/z = 461$ a teprve poté fragmentuje zbytek molekuly za vzniku dceřiných iontů s $m/z = 380$,

296, 227, 156 a 70. Z analogických MS/MS spekter všech čtyř neznámých látek lze usuzovat, že se jedná o velmi podobné látky lišící se pouze počtem dvojných vazeb (v případě látek s M_r 852,49; 854,50 a 858,52) případně ještě skupinou CH_2 (v případě látky s M_r 840,49). Skutečnost, že se jedná o příbuzné látky dokazují i totožná UV spektra látek ve frakci 192/4a a 192/4c (Obr. 19) změřená během jejich UPLC analýzy. Toto UV spektrum není typické pro žádnou skupinu látek nejčastěji produkovaných aktinomycetami, které jsou podrobněji popsány v kap. 1.1.4. Dále je v MS/MS spektrech odpovídajících čtyřem neznámým látkám možné pozorovat až čtyři ionty, jejichž m/z se liší o 18, z čehož vyplývá, že uvedené látky zřejmě obsahují minimálně tři OH skupiny.

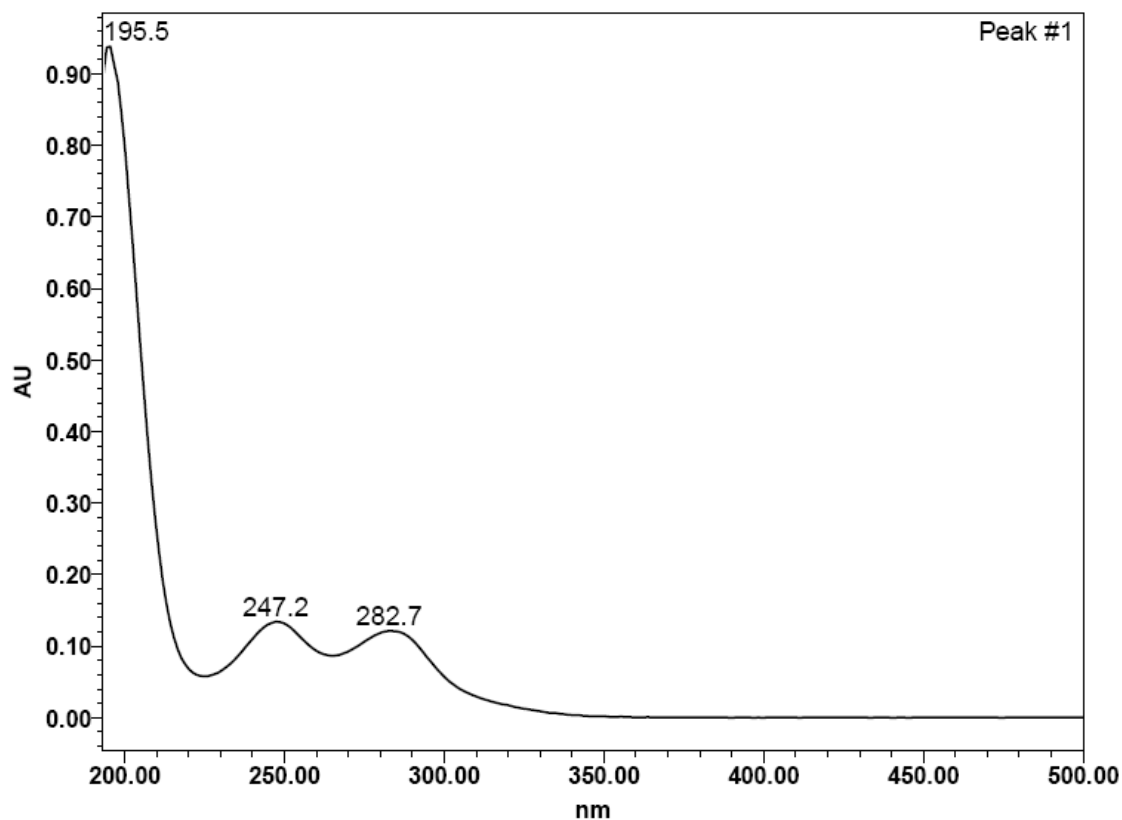
Tab. 2 Přehled látek nalezených v databázi; extrakt kultivačního média č. 192

Název*	Vzorec	Průměrná M_r	Monoizotopická M_r	Odchylka (exp. M_r - m. M_r)
FRAKCE 192/4a - experimentální M_r 840,49				
Rudolfomycin	$\text{C}_{42}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{16}$	840,87	840,33	0,16
Mureidomycin A	$\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$	840,91	840,31	0,18
Pradimicin A	$\text{C}_{40}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_{18}$	840,78	840,26	0,23
FRAKCE 192/4a - experimentální M_r 852,49				
Efepistin [INN]	$\text{C}_{44}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{10}$	852,94	852,38	0,11
Viroisin, 2-(2-(methylsulfinyl)-L-tryptophan)-3-(4,5-dihydroxy-L-leucine)-4-L-alanine-7	$\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_{14}\text{S}$	852,92	852,33	0,16
Mureidomycin E	$\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$	852,92	852,31	0,18
Mureidomycin F	$\text{C}_{39}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$	852,92	852,31	0,18
FRAKCE 192/4c - experimentální M_r 854,50				
Glucosillaren A	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{18}$	854,93	854,39	0,11
4'''(R)-N-Acetamideaclacinomycin A	$\text{C}_{44}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{15}$	854,94	854,38	0,12
Chimeramycin B	$\text{C}_{45}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{13}$	855,11	854,55	0,05
N,N-Dimethylpradimicin C	$\text{C}_{41}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_{18}$	854,81	854,27	0,23
Lydicamycin	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{10}$	855,12	854,54	0,04
Napsamycin C	$\text{C}_{39}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}$	854,93	854,33	0,17
Dutomycin	$\text{C}_{44}\text{H}_{54}\text{O}_{17}$	854,89	854,34	0,16
FRAKCE 192/4c - experimentální M_r 858,52				
Rifamycin B ethylphenylamide	$\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{13}$	858,98	858,39	0,13
Rifamycin B benzylmethylamide	$\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{N}_2\text{O}_{13}$	858,98	858,39	0,13
Avermectin A1a, 3'',5-di-O-demethyl-, (8Z)-	$\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{O}_{14}$	859,06	858,48	0,04

* Názvy látek nebyly z anglického jazyka překládány - jsou uvedeny v původním tvaru.

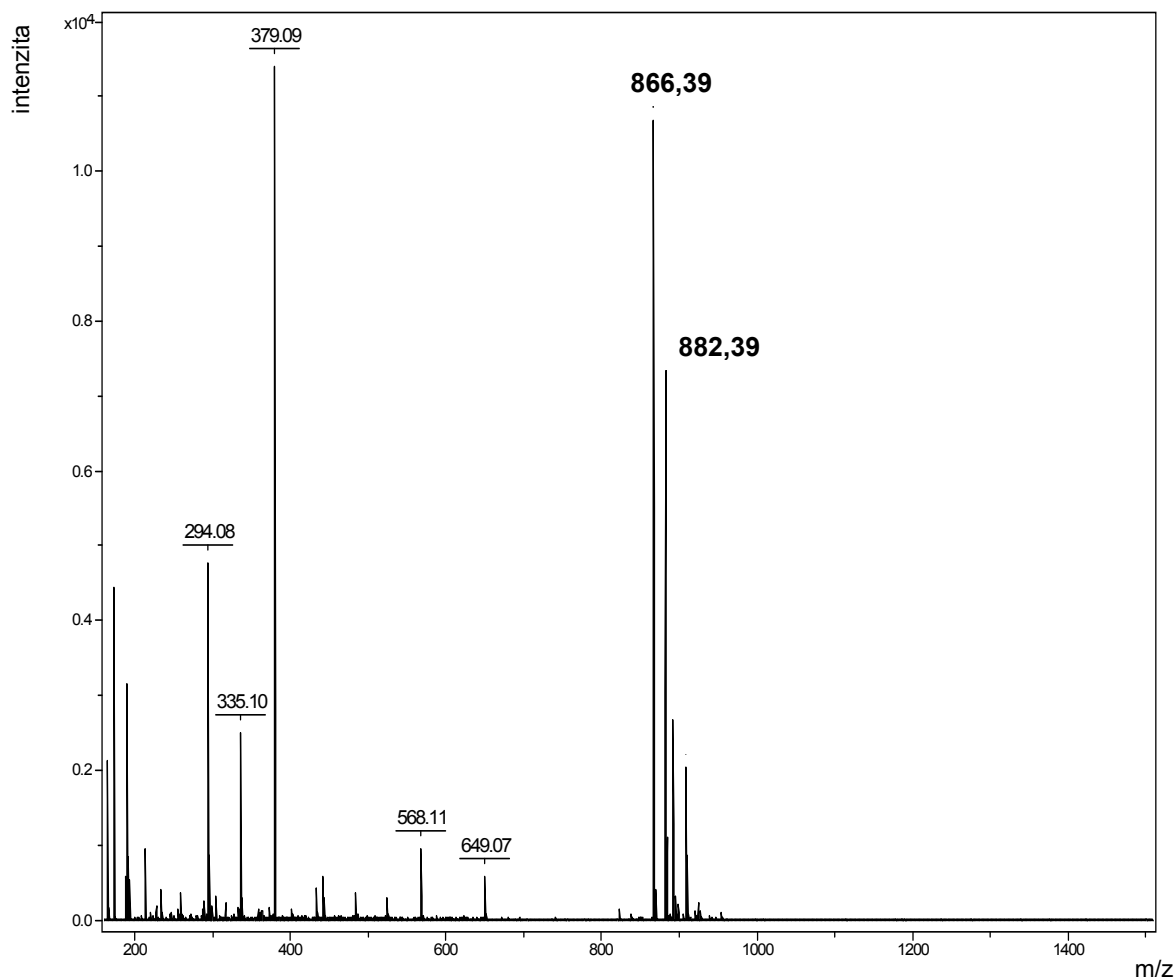


Obr. 18 PSD-MS/MS spektrum, frakce 192/4a, iont o $m/z = 841$. MS podmínky: MALDI-TOF/TOF, FA matrice, pozitivní mód



Obr. 19 UV spektrum látek ve frakci 192/4a a 192/4c. UV spektrum bylo extrahováno z chromatografického píku s retenčním časem X,Y min během UPLC analýzy za následujících podmínek: mobilní fáze - 10 mmol l⁻¹ NH₄COOH o pH 9,0 a acetonitril, další podmínky viz legenda k Obr. 13.

Analogickým způsobem jako u vzorku 192/4a a 192/4c byly i ve frakci 239/3 určeny monoizotopické M_r dvou látek, a to 865,39 a 881,39. Hmotnostní spektrum frakce 239/3 je znázorněné na Obr. 20.



Obr. 20 MS spektrum (MALDI-TOF) vzorku 239/3. MS podmínky: MALDI-TOF, CCA matrice, pozitivní mód

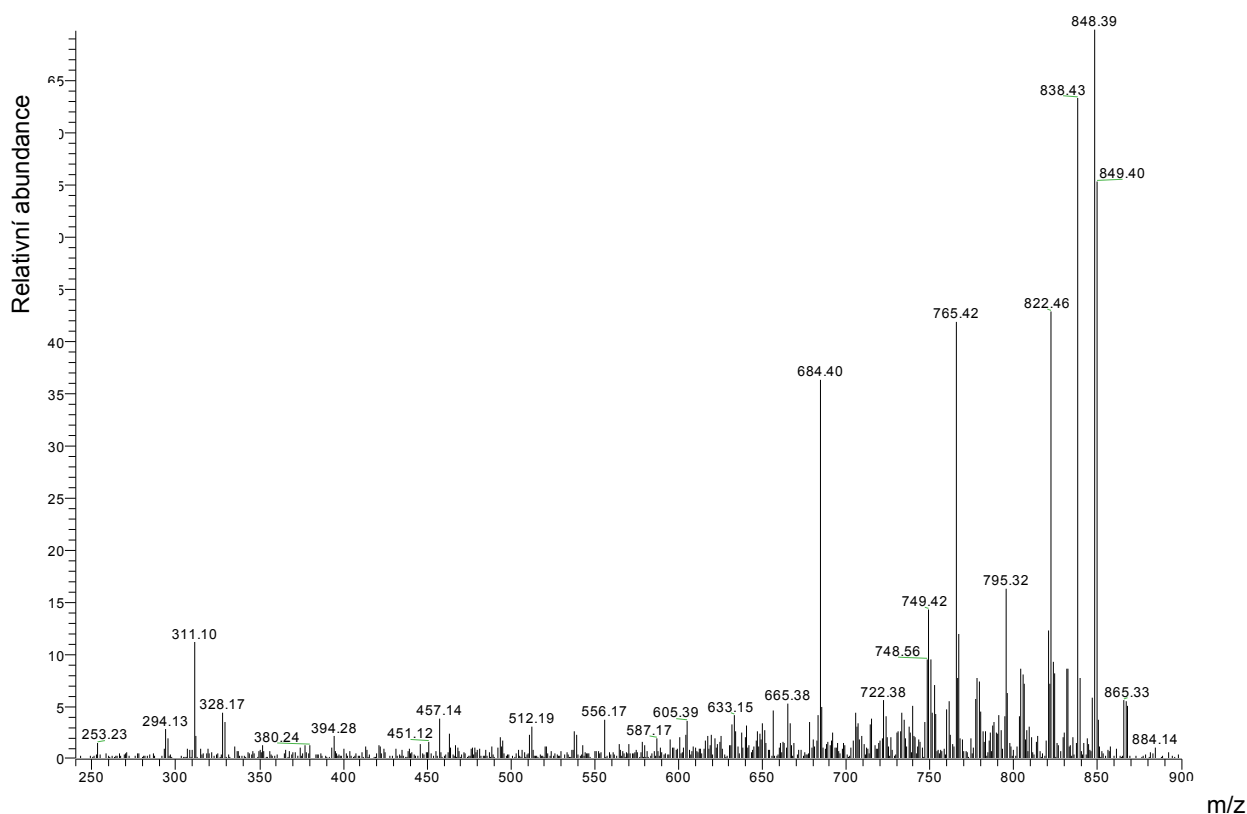
V databázi ChemIDplus Advanced⁶⁵ byly opět vyhledány látky s monoizotopickou M_r odpovídají experimentálním hodnotám monoizotopické M_r nalezených látek ve frakci 239/3 s tolerancí $M_r \pm 0,5$. Tab. 3 uvádí čtyři nalezené látky, ovšem ani v tomto případě MS/MS spektra odpovídající jednotlivým látkám ve frakci 239/3 neodpovídají žádné teoreticky predikované fragmentaci z látek nalezených. MS/MS spektrum iontu o $m/z = 866$ odpovídající látce o $M_r = 865,39$ je uvedeno na Obr. 21. MS/MS spektrum iontu odpovídajícího látce o $M_r 881,39$ je analogické, tvořené především píky

s hodnotou m/z o 16 vyšší. Na Obr. 22 je znázorněno UV spektrum dvou příbuzných látek ve frakci 239/3. Ani v tomto případě se nejedná o UV spektrum, které by odpovídalo některé hlavní skupině látek produkovaných aktinomycetami (viz kap. 4.1.1).

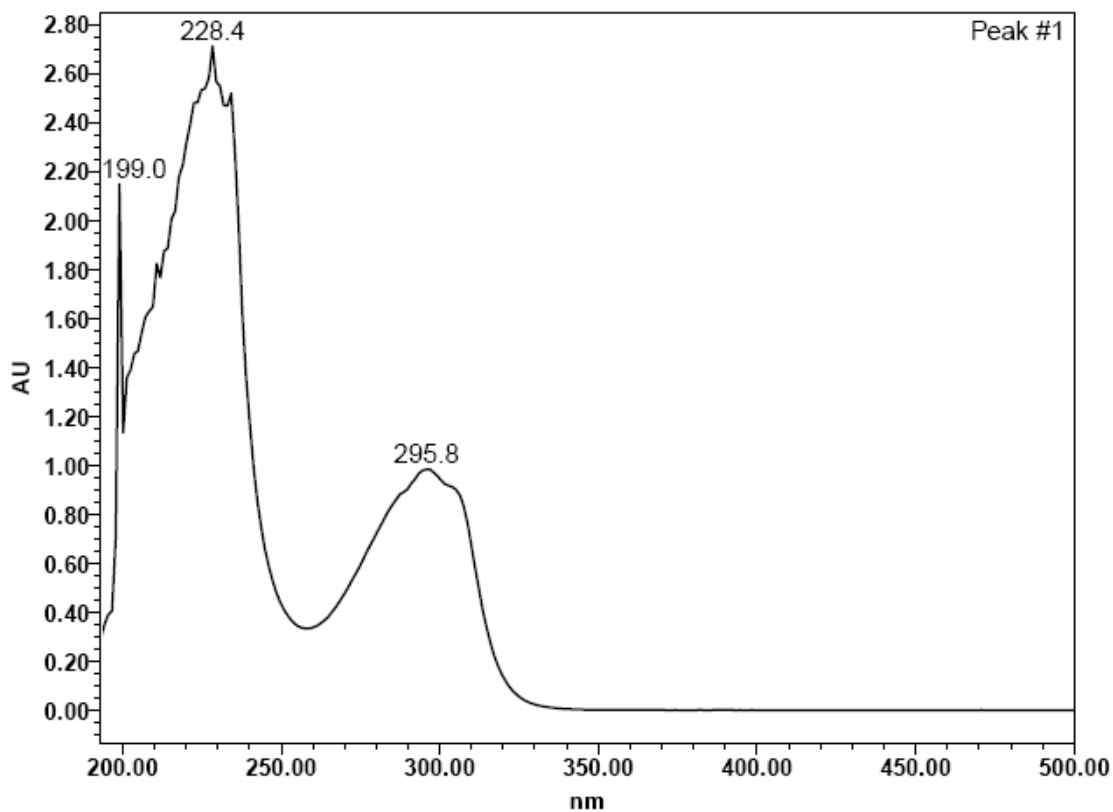
Tab. 3 Přehled látek nalezených v databázi; extrakt kultivačního média č. 239

Název*	Vzorec	Průměrná M_r	Monoizotopická M_r	Odchyłka (exp. M_r -m. M_r)
FRAKCE 239/3 - experimentální M_r 865,39				
Concanamycin A	$C_{46}H_{75}NO_{14}$	866,09	865,52	0,13
FRAKCE 239/3 - experimentální M_r 881,39				
Rifamycin B butyl-diethylhydrazide	$C_{47}H_{67}N_3O_{13}$	882,05	881,47	0,08
Pheganomycin DR	$C_{36}H_{59}N_{13}O_{13}$	881,94	881,44	0,05
Lactoferrin (673-679)	$C_{43}H_{63}N_9O_{11}$	882,02	881,46	0,07

*Názvy látek nebyly z anglického jazyka překládány - jsou uvedeny v původním tvaru.



Obr. 21 CID-MS/MS spektrum, frakce 239/3, iont o $m/z = 866$. MS podmínky: LCQ^{DECA}, iontová past, pozitivní mód



Obr. 22 UV spektrum látek ve frakci 239/3. UV spektrum bylo extrahováno z chromatografického píku s retenčním časem X,Y min během UPLC analýzy za následujících podmínek: mobilní fáze - 0,1 % vodný roztok TFA a acetonitril, další podmínky viz legenda k Obr. 13.

4 ZÁVĚR

Pro extrakty kultivačních médií aktinomycet č. 192 a 239 byly nalezeny vhodné experimentální podmínky pro UPLC analýzu a preparaci. Z obou kultivačních médií se podařilo izolovat několik frakcí látek, z nichž některé na základě pozitivního testu na biologickou aktivitu obsahovaly látky s antibiotickou aktivitou. Tyto látky se podařilo izolovat v dostatečné čistotě a množství pro jejich MS analýzu.

Na základě MS analýzy se podařilo určit relativní molekulovou hmotnost čtyř příbuzných, biologicky aktivních látek produkovaných aktinomycetou č. 192 a dvou opět vzájemně podobných, biologicky aktivních látek produkovaných aktinomycetou č. 239.

Neznámé biologicky aktivní látky neodpovídaly žádným látkám s podobnou relativní molekulovou hmotností vyhledaných v chemické databázi, což podporuje hypotézu, že se jedná o nové, dosud nepopsané látky. Pro jejich bližší identifikaci je potřeba provést další experimenty jinými technikami MS nebo technikou NMR.

Charakteristiky biologicky aktivních látek produkovaných aktinomycetami č. 192 a 239 jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4 Charakteristiky studovaných biologicky aktivních látek

Vzorek	Frakce	Vhodná mobilní fáze*	UV absorpční maxima (nm)	M_r
192	192/4a	10 mM NH ₄ COOH, pH 9	196, 247, 283	840,49
				852,49
	192/4c			854,50
				858,52
239	239/3	0,1 % TFA	228, 296	865,39 881,39

* Ostatní chromatografické podmínky: Dávkovaný objem 5 μ l; chromatografická kolona Acquity BEH C18 (Waters); průtoková rychlost 0,4 ml min⁻¹; lineární gradient (min/% acetonitrilu): 0/5; 7/27; 12/33; 17/88; 18/100; 20/100.

5 LITERATURA

1. O'Grady F., Lambert H. P., Finch R. G., Greenwood D.: *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective agents and their use in therapy*, 7th ed., New York, Livingstone (1997).
2. Zahradický J.: *Antibiotika a chemoterapeutika*, 1. vyd., Praha, SPN (1982).
3. Bérdy J.: Recent Developments of Antibiotic Research and Classification of Antibiotics According to Chemical Structure, *Advances in Applied Mikrobiology*, **18**, 309-406 (1974).
4. Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D.: How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?, *Archives of microbiology*, **176** (5), 386-390 (2001).
5. Kieser T., Bibb M. J., Bittner M. J., Chater K. F., Hopwood D. A.: *Practical Streptomyces Genetics*, Norwich, The John Innes Foundation (2000).
6. Petkovska E., Slaveska-Raicki R., Rafajlovska V.: Determination of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline in milk by TLC and column chromatography using Amberlite XAD-2, *Chemia Analityczna*, **51** (2), 275-283 (2006).
7. Choma I., Grenda D., Malinowska I., Suprynowicz Z.: Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method, *Journal of Chromatography B*, **734** (1), 7-14 (1999).
8. Ruz N., Zabala M., Kramer M. G., Campanero M. A., Dios-Vieitez M. C., Blanco-Prieto M. J.: Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography - Application to particulate drug delivery systems, *Journal of Chromatography A*, **1031** (1-2), 295-301 (2004).
9. Prevosto J. M., Beraud B., Cheminel V., Gaillard Y., Mounier C., Chaulet J. F.: Determination of doxycycline in human plasma and urine samples by high-performance liquid-chromatography—Application for drug-monitoring in malaria chemoprophylaxis, *Annales de Biologie Clinique*, **53** (1-2), 29-32 (1995).
10. Samanidou V. F., Nikolaidou K. I., Papadoyannis L.N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union Decision 2002/657/EC, *Journal of Separation Science*, **30** (15), 2430-2439 (2007).
11. Samanidou V. F., Nikolaidou K. I., Papadoyannis L.N.: Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of tetracycline

-
- antibiotics residues in bovine muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC, *Journal of Separation Science*, **28** (17), 2247-2258 (2005).
12. De Ruyck H., De Ridder H.: Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21** (9), 1511-1520 (2007).
 13. Hirscha R., Ternesa T., Haberera K., Kratzb K. L.: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *The Science of The Total Environment*, **225** (1-2), 109-118 (1999).
 14. Yang S. W., Cha J., Carlson K.: Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18** (18), 2131-2145 (2004).
 15. Pena A., Pelantova N., Lino C. M., Silveira M. I. N., Solich P.: Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53** (10), 3784-3788 (2005).
 16. Lu H. T., Jiang Y., Li H. B., Chen F., Wong M. H.: Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, tetracycline and chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Chromatographia*, **60** (5-6), 259-264 (2004).
 17. Charoenraks T., Chuanuwatanakul S., Honda K., Yamaguchi Y., Chailapakul O.: Analysis of tetracycline antibiotics using HPLC with pulsed amperometric detection, *Analytical Science*, **21** (3), 241-245 (2005).
 18. Zhang Y. T., Zhang Z. J., Sun Y. H.: Determination of tetracyclines residues in milk using high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Acta Chemica Sinica*, **64** (24), 2461-2466 (2006).
 19. Gil E. C., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J.: Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis - Method development and validation, *Journal of Chromatography A*, **895** (1-2), 43-49 (2000).
 20. Injac R., Kac J., Kreft S., Strukelj B.: Determination of doxycycline in pharmaceuticals and human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **387** (2), 695-701 (2007).
 21. Tsuji K., Robertso J. H.: Determination of erythromycin and its derivatives by gas-liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, **43** (7), 818-& (1971).

-
22. Stubbs C., Haigh J. M., Langer I.: Determination of erythromycin in serum and urine by high-performance liquid-chromatography with ultra violet detection, *Journal of Pharmaceutical Science*, **74** (10), 1126-1128 (1985).
 23. Khashaba Y.P.: Spectrofluorimetric analysis of certain macrolide antibiotics in bulk and pharmaceutical formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **27** (6), 923-932 (2002).
 24. De la Huebra M. J. G., Bordin G., Rodríguez A. R.: Comparative study of coulometric and amperometric detection for the determination of macrolides in human urine using high-performance liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **375** (8), 1031–1037 (2003).
 25. Kees F., Spangler S., Wellenhofer M.: Determination of macrolides in biological matrices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, **812** (1-2), 287-293 (1998).
 26. Pappa-Louisia A., Papageorgiou A., Zitroua A., Sotiropoulosa S., Georgarakis E., Zougrou F.: Study on the electrochemical detection of the macrolide antibiotics clarithromycin and roxithromycin in reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, **755** (1-2), 57-64 (2001).
 27. Senta I., Terzic S., Ahel M.: Simultaneous Determination of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and River Water by LC-Tandem-MS, *Chromatographia*, **68** (9-10), 747-758 (2008).
 28. Hammel Y.-A., Mohamed R., Gremaud E., LeBreton M.-H., Guy P. A.: Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1177** (1), 58-76 (2008).
 29. Groll A.H., Mickiene D., Werner K., Piscitelli S.C., Walsh T.J.: High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies, *Journal of Chromatography B*, **735** (1), 51-62 (1999).
 30. Llabot J.A., Allemandi D.A., Manzo R.H., Longhi M.R.: HPLC method for the determination of nystatin in saliva for application in clinical studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **45** (3), 526-530 (2007).
 31. Luo W., Yin B., Ang C.Y.W., Rushing L., Thompson H.C. Jr.: Determination of lincomycin residues in salmon tissues by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Journal of Chromatography B*, **687** (2), 405-411 (1996).
 32. Moats W.A.: Determination of lincomycin in milk and tissues by reversed-phase liquid-chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** (10), 1812-1816 (1991).

-
33. Dousa M., Sikac Z., Halama M., Lemr K.: HPLC determination of lincomycin in premixes and feedstuffs with solid-phase extraction on HLB OASIS and LC-MS/MS confirmation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **40** (4), 981-986 (2006).
 34. Orwa J.A., Bosmans F., Depuydt S., Roets E., Hoogmartens J.: Liquid chromatographic method for separation of lincomycin from its related substances, *Journal of Chromatography A*, **829** (1-2), 161-166 (1998).
 35. Olsovská J., Jelinková M., Man P., Koberská M., Janata J., Flieger M.: High-throughput quantification of lincomycin traces in fermentation broth of genetically modified *Streptomyces* spp. Comparison of ultra-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography with UV detection, *Journal of Chromatography A*, **1139** (2), 214-220 (2007).
 36. Platzer D.J., White B.A.: Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41** (1), 84-88 (2006).
 37. Sz'unyog J., Adams E., Liekens K., Roets E., Hoogmartens J.: Analysis of a formulation containing lincomycin and spectinomycin by liquid chromatography with pulsed electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29** (1-2), 213-220 (2002).
 38. Crellin K.C., Sible E., Van Antwerp J.: Quantification and confirmation of identity of analytes in various matrices with in-source collision-induced dissociation on a single quadrupole mass spectrometer, *International Journal of Mass Spectrometry*, **222** (1-3), 281-311 (2003).
 39. Sin D.W.M., Wong Z.C., Ip A.C.B.: Quantitative analysis of lincomycin in animal tissues and bovine milk by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **34** (3), 651-659 (2004).
 40. Sin D.W.M., Clare H., Wong Y.C., Ho S.K., Ip A.C.B.: Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M-1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **517** (1-2), 39-45 (2004).
 41. Thompson T.S., Noot D.K., Calvert J., Černal S.F.: Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1020** (2), 241-250 (2003).

-
42. Yu C.Z., He Y.Z., Fu G.N., Xie H.Y., Gan W.E.: Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, **877** (3), 333-338 (2009).
 43. Mashata M., Chrystyn H., Clark B. J., Assi K. H.: Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science*, **869** (1-2), 59-66 (2008).
 44. Zhou Y.X., Yang W.J., Zhang L.Y., Wang Z.Y.: Determination of kanamycin A in animal feeds by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **30** (9-12), 1603-1615 (2007).
 45. Posyniak A., Zmudzki J., Niedzielska J.: Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **914** (1-2), 59-66 (2001).
 46. Mascher D.G., Unger C.P., Mascher H.J.: Determination of neomycin and bacitracin in human or rabbit serum by HPLC-MS/MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **43** (2), 691-700 (2007).
 47. Lecaroz C., Campanero M.A., Gamazo C., Blanco-Prieto M.J.: Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric Method, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58** (3), 557-563 (2006).
 48. McLauchlin L.G., Henion J.D., Kijak P.J.: Multi-Residue confirmation of aminoglycoside antibiotics and bovine kidney by ion-spray high-performance liquid-chromatography tandem mass-spectrometry, *Biological Mass Spectrometry*, **23** (7), 417-429 (1994).
 49. McLauchlin L.G., Henion J.D.: Determination of aminoglycoside antibiotics by reversed-phase ion-pair high-performance liquid-chromatography coupled with pulsed amperometry and ion spray mass-spectrometry, *Journal of Chromatography*, **591** (1-2), 195-206 (1992).
 50. Hampl F., Paleček J.; *Farmakochemie*, 1. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha (2002).
 51. Aminov R.I., Mackie R.I.: Evolution and ecology of antibiotic resistance genes, *FEMS Microbiology Letters*, **271** (2), 147-161 (2007).

-
52. <http://www.zdn.cz/> [cit. 10.7.2009].
 53. Berretti R.: <http://phagetherapylightandshade.blogspot.com/2009/12/examining-genomes.html> [cit. 26.2.2010].
 54. Baltz R.H.: Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration?, *Journal of Industrial Mikrobiology & Biotechnology*, **33** (7), 507-513 (2006).
 55. Knight V., Sanglier J. J., DiTullio D., Braccili S., Bonner P., Waters J., Hughes D., Zhang L.: Diversifying microbial natural products for drug discovery, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **62** (5-6), 446-458 (2003).
 56. Jaspars M., Lawton L.: Cyanobacteria - a novel source of pharmaceuticals, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **1**, 77-84 (1998).
 57. Blunt J., Copp B. R., Munro M. H., Northcote P. T., Prinsep M. R.: Marine natural products, *Natural Product Report*, **22** (1), 15-61 (2005).
 58. Brock T. D., Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.: *Biology of Microorganisms*, seventh editon, Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Persey (1994).
 59. Fedeniuk R.W., Srand P. J.: Theory and methodology of antibiotic extraction from biomatrices, *Journal of Chromatography A*, **812** (1-2), 3-15 (1998).
 60. Kellner R., et al.: *Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science*, 2nd ed., John Wiley & Sons (2004).
 61. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513209> [cit. 18.3.2010].
 62. Wren S.A.C., Tchelitcheff P.: Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development, *Journal of Chromatography A*, **1119** (1-2), 140-146 (2006).
 63. 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** (12), 1836-1848 (2006).
 64. <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513206> [cit. 25.3.2010].
 65. United States National Library of Medicine: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/> [cit. 18.3.2010].