

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

STANOVENÍ PREKURZORŮ LINKOMYCINU
V KULTIVAČNÍM MÉDIU
STREPTOMYCES LINCOLNENSIS POMOCÍ
VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ
CHROMATOGRRAFIE S FLUORESCENČNÍ
DETEKČÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

STUDIJNÍHO OBORU ANALYTICKÁ CHEMIE

Praha 2007

Zdeněk Kameník

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D. a konzultanta RNDr. Jany Olšovské, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom 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 28. dubna 2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Kauč', written in a cursive style.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	6
1 ÚVOD	7
1.1 <i>Streptomyces</i> jako zdroj antibiotik	7
1.1.1 <i>Streptomyces lincolnensis</i> , linkomycin, linkosamidy	7
1.1.2 Biosyntetická dráha linkomycinu	9
1.1.3 Geny <i>Streptomyces lincolnensis</i> určující biosyntézu linkomycinu	11
1.2 Cíl diplomové práce	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1 4-propylprolin	13
2.1.1 Vlastnosti prolinu a 4-propylprolinu	13
2.1.2 Přehled analytických metod stanovení 4-propylprolinu a prolinu	14
2.1.3 Výběr způsobu derivatizace a detekce	16
2.2 N-demethyllinkomycin	19
2.2.1 Vlastnosti N-demethyllinkomycinu	19
2.2.2 Přehled analytických metod stanovení N-demethyllinkomycinu a linkomycinu	20
2.2.3 Výběr způsobu derivatizace a detekce	21
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1 Použité chemikálie a standardy	22
3.1.1 Chemikálie	22
3.1.2 Standardy	23
3.2 Reálné vzorky	24
3.2.1 Kmen <i>Streptomyces lincolnensis</i> a jeho genetická modifikace	24
3.2.2 Podmínky kultivace	24
3.2.3 Příprava, přehled a skladování reálných vzorků	25

3.3	Použité přístroje a metody	26
3.3.1	Přístroje	26
3.3.2	Příprava pufrů	26
3.3.3	Zpracování dat a matematické výpočty	27
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	28
4.1	Stanovení 4-propylprolinu	28
4.1.1	Chromatografické podmínky a podmínky detekce	28
4.1.2	Oxidace a derivatizace 4-propylprolinu	30
4.1.2.1	Vliv koncentrace chloraminu-T a borohydridu sodného na oxidaci 4-propylprolinu	31
4.1.2.2	Vliv koncentrace OPA na derivatizaci 4-propylprolinu	32
4.1.2.3	Vliv teploty na oxidaci 4-propylprolinu	33
4.1.2.4	Vliv pH na oxidaci a derivatizaci 4-propylprolinu	34
4.1.2.5	Vliv doby reakce na oxidaci 4-propylprolinu	35
4.1.2.6	Vliv nadbytku činidel na oxidaci a derivatizaci 4-propylprolinu	37
4.1.3	Stabilita oxidovaného 4-propylprolinu a jeho derivátu s OPA	38
4.1.4	Metoda stanovení 4-propylprolinu – shrnutí	39
4.1.5	Validace metody	40
4.1.5.1	Selektivita metody	41
4.1.5.2	Kalibrační přímka, LOD, LOQ	41
4.1.5.3	Správnost a přesnost metody	43
4.1.5.4	Robustnost metody	44
4.1.6	Aplikace metody (reálné vzorky)	46
4.2	Stanovení N-demethylkomycinu	50
4.2.1	Chromatografické podmínky a podmínky detekce	50
4.2.2	Derivatizace N-demethylkomycinu	51
4.2.2.1	Vliv nadbytku NBD-Cl na derivatizaci N-demethylkomycinu	51
4.2.2.2	Vliv teploty reakce na derivatizaci N-demethylkomycinu	52
4.2.2.3	Vliv doby reakce na derivatizaci N-demethylkomycinu	53

4.2.3	Stabilita derivatizovaného N-demethylinkomycinu	54
4.2.4	Metoda stanovení N-demethylinkomycinu – shrnutí	55
4.2.5	Validace metody	56
4.2.5.1	Selektivita metody	56
4.2.5.2	Kalibrační přímka, LOD, LOQ	57
4.2.5.3	Správnost a přesnost metody	59
4.2.5.4	Robustnost metody	60
4.2.6	Aplikace metody (reálné vzorky)	62
5	ZÁVĚR	63
	Použitá literatura	64
	Poděkování	71

Seznam použitých zkratek a symbolů

a	směrnice lineární regrese
A	plocha pod píkem
c	koncentrace
c_{real}	naměřená koncentrace
c_{nom}	nominální koncentrace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
I.D.	vnitřní průměr
L-DOPA	L-dihydroxyfenylalanin
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
mM	milimolární
M	molární
MS	hmotnostní spektrometrie
NDL	N-demethylkomycin
obr.	obrázek
PPL	4-L-propylprolin
r	korelační koeficient
r^2	determinační koeficient
RSD	relativní směrodatná odchylka
$s_{y/x}$	směrodatná odchylka lineární regrese
SD	směrodatná odchylka
t	čas
t_r	retenční čas
T	teplota
tab.	tabulka
V	objem
x	správnost
λ	vlnová délka

zkratky derivatizačních činidel viz tab. 2.1 (kapitola 2.1.2)

označení reálných vzorků viz tab. 3.1 (kapitola 3.2.3)

1 ÚVOD

1.1 *Streptomyces* jako zdroj antibiotik

Antibiotika jsou přírodní látky s chemicky velmi různorodou strukturou. Jsou produkována především bakteriemi, ale i jinými organismy (houby, řasy, vyšší rostliny) jako sekundární metabolity, tedy jako látky, které nejsou nezbytně nutné pro růst a rozmnožování organismu.

Antibiotika se využívají především pro své antibakteriální, antifungální, antivirové, antitumorové a antimetabolické účinky při léčbě nemocí.

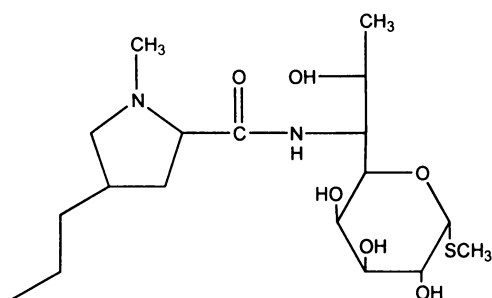
V současné době je známo několik tisíc antibiotik. Více než polovina z nich je produkována bakteriemi *Actinomyces*, nejčastěji rodem *Streptomyces*.

1.1.1 *Streptomyces lincolnensis*, linkomycin, linkosamidy

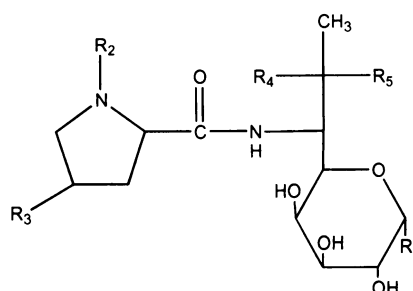
Bakterie *Streptomyces lincolnensis* z rodu *Streptomyces* je významným producentem antibiotika linkomycinu A (dále linkomycin). Ten byl izolován také z kultur *Streptomyces espinosus*, *Streptomyces variabilis*, *Streptomyces vellosus*, *Streptomyces pseudogriseolus* a bakterie *Micromonospora halophytica* [1].

Molekula linkomycinu (obr. 1.1a) je tvořena dvěma částmi, částí aminokyselinovou a sacharidovou. Aminokyselinovou částí je derivát prolinu, 4-L-propylprolin (dále 4-propylprolin), sacharidovou částí je methyl-6-amino-6,8-dideoxy-1-thio-D-erythro- α -D-galaktooktopyranóza (dále methylthiolinkosamid).

Linkomycin patří do širší skupiny strukturně podobných látek, které se nazývají linkosamidy. Obecný vzorec linkosamidů je na obr. 1.1b, přehled popsáných linkosamidů je uveden v tab. 1.1.



Obr. 1.1a: Linkomycin



Obr.1.1b: Obecný vzorec linkosamidů

Tab. 1.1: Přehled linkosamidů

Linkosamid	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Linkomycin A	SCH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	OH	H
Linkomycin B	SCH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₃	OH	H
Linkomycin D	SCH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	OH	H
Linkomycin S	SCH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	OH	H
Linkomycin K	SCH ₂ CH ₃	H	CH ₂ CH ₂ CH ₃	OH	H
Klindamycin	SCH ₃	CH ₃	CH ₂ CH ₂ CH ₃	H	Cl

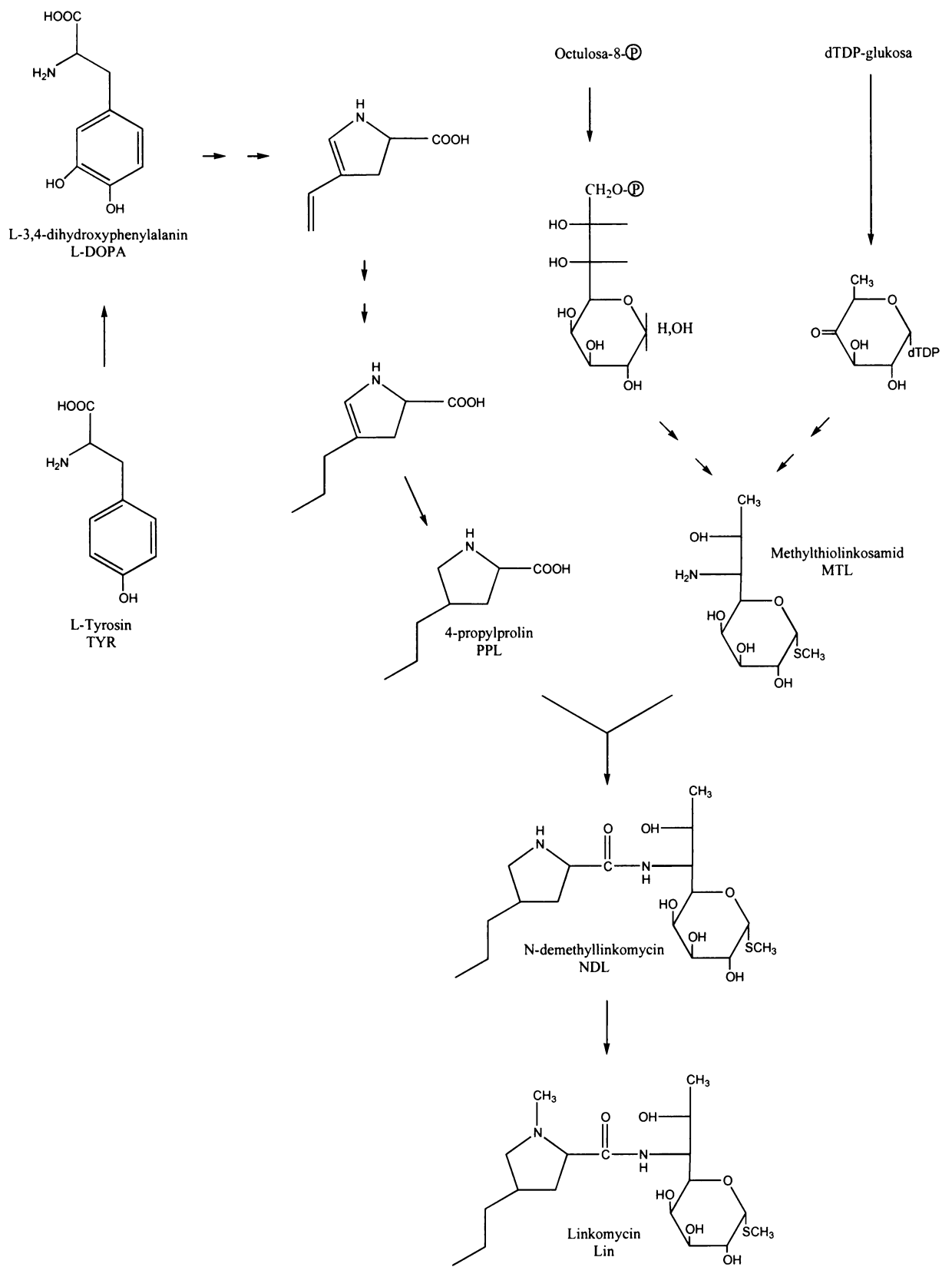
Jednotlivé linkosamidy se svou antibakteriální účinností liší. Nejúčinnějším antibiotikem je klindamycin obsahující ve své molekule chlor. Klindamycin se jako jediný z uvedených linkosamidů syntetizuje uměle. Přírozně syntetizovaný linkomycin je méně účinný. Linkomycin B, který se od linkomycinu liší jednou methylenovou skupinou, vykazuje účinnost ještě nižší. Linkomycin B je produkován *Streptomyces lincolnensis* jako vedlejší produkt. Produkce ostatních linkosamidů může být docílena změnou podmínek kultivace a složením kultivačního média [1].

Linkosamidy jsou účinné proti většině běžným aerobním Gram-pozitivním bakteriím (např. streptokok, stafylokok, pneumokok). Klindamycin působí také proti některým anaerobním Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím [1]. Velký potenciál je ve využití klindamycinu, případně dalších linkosamidů jako antimalarik.

Pro studium linkosamidů, jejich přípravy a průmyslové výroby je třeba vyjít z biosyntetické dráhy linkomycinu.

1.1.2 Biosyntetická dráha linkomycinu

Biosyntetická dráha linkomycinu je znázorněna na obr. 1.2. Na počátku syntézy aminokyselinové části je L-tyrosin, který se přes L-DOPA a další meziprodukty přeměňuje na 4-propylprolin. Sacharidová část biosyntézy zatím není plně prostudována. Existují dvě alternativní cesty, na jejichž konci vzniká methylthiolinkosamid. V dalším kroku je 4-propylprolin spojen peptidovou vazbou s methylthiolinkosamidem. Tento meziprodukt se nazývá N-demethyllinkomycin. Závěrečným krokem biosyntézy je methylace dusíkového atomu za vzniku linkomycinu [2,3].



Obr. 1.2: Biosyntetická dráha linkomycinu [2,3]

1.1.3 Geny *Streptomyces lincolnensis* určující biosyntézu linkomycinu

Každý krok v biosyntéze linkomycinu předurčuje určitý gen (geny). Gen je předpisem pro vznik proteinu, který se účastní biosyntézy linkomycinu. Protein buď přímo řídí určitý krok v biosyntéze (např. syntézu 4-propylprolinu a methylthiolinkosamidu nebo metylaci N-demetyllinkomycinu) nebo tento krok pouze reguluje (regulační protein, regulační gen).

Jednou z metod, jak lze studovat funkci proteinu, je inaktivace genu, který tento protein kóduje. To zjednodušeně znamená, že se zkoumaný gen odstraní a tím se zruší produkce příslušného proteinu. Sleduje se vliv absence tohoto proteinu na biosyntézu linkomycinu. Tento krok se provádí kultivací *Streptomyces lincolnensis* s inaktivovaným sledovaným genem. V kultivačním médiu se potom sledují koncentrace linkomycinu a jeho prekursorů. Koncentrace jednotlivých látek se nemusí změnit, může se významně snížit (regulační protein), zvýšit (látka se hromadí v důsledku zastavení biosyntézy) nebo nebude látka v kultivačním médiu vůbec přítomna (biosyntéza byla zastavena před dokončením syntézy látky). Z koncentrací linkomycinu a jeho prekursorů lze usuzovat o funkci proteinu.

V současné době je funkce některých biosyntetických proteinů již prokázána, u některých je pouze hypotetická a v některých případech není dosud známá. V tab. 1.2 jsou uvedeny vybrané geny *Streptomyces lincolnensis* zodpovědné za biosyntézu linkomycinu a funkce proteinu, který je tímto genem kódován.

Tab. 1.2: Vybrané geny *Streptomyces lincolnensis* zodpovědné za biosyntézu linkomycinu

Gen	Funkce proteinu	Poznámka
lmb N	Izomeráza v MTL části biosyntézy	hypotetické
lmb D	Neznámá	---
lmb X	Oxidoreduktáza v PPL části biosyntézy	hypotetické
lmb B ₂	Přeměna Tyr na L-DOPA	prokázáno
lmb W	Methyltransferáza v PPL části biosyntézy	hypotetické
lmb U	Regulační gen	hypotetické
lmb V	Neznámá	---

1.2 Cíl diplomové práce

Ve spojitosti s výzkumem produkce linkomycinu *Streptomyces lincolnensis* bylo nutné vyvinout metodu stanovení pro následující látky: linkomycin, N-demethyllinkomycin, methylthiolinkosamid, 4-propylprolin a L-DOPA.

V chemické literatuře jsou popsány metody stanovení linkomycinu [4], L-DOPA [5] a methylthiolinkosamidu [6] v kultivačním médiu. Metoda stanovení 4-propylprolinu a N-demethyllinkomycinu zatím popsána nebyla.

Cílem diplomové práce bylo vyvinout analytickou metodu stanovení 4-propylprolinu a N-demethyllinkomycinu v matrici kultivačního média *Streptomyces lincolnensis*, která splňuje kritéria uvedená dále.

Kultivační médium je složitá matrice. Obsahuje celou řadu látek nutných pro růst bakterie (soli, sacharidy apod.) a velké množství látek vznikajících v rámci metabolismu *Streptomyces lincolnensis*. To klade nárok na selektivitu metody.

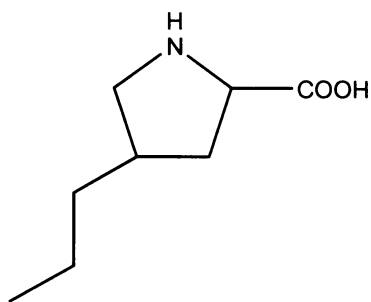
Klíčovými parametry vyvíjených metod byly limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ). Často je třeba rozlišit mezi situací, kdy je analyt produkován v nízkých koncentracích a kdy není produkován vůbec. Limit detekce se proto musí pohybovat řádově v jednotkách $\mu\text{g ml}^{-1}$ analytu v kultivačním médiu. Limit stanovitelnosti nesmí překročit hodnotu $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ analytu v kultivačním médiu.

V neposlední řadě je nutné, aby metoda byla reprodukovatelná, dostatečně robustní a spolehlivá. Metoda musí být co nejjednodušší, nejlépe s možností automatizace a musí splňovat i ekonomická kritéria.

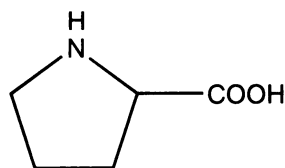
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 4-propylprolin

4-propylprolin je sloučenina odvozená od prolinu připojením propylového zbytku v poloze 4. Jak je vidět z obr. 2.1a a 2.1b, prolin i 4-propylprolin jsou sekundární aminokyseliny, neboť jejich aminoskupina je zapojená v kruhu. Podle starého názvosloví bývají pro svoji sekundární aminoskupinu nazývány nesprávně iminokyseliny, systematicky by se měly správně nazývat pyrrolidinkarboxylové kyseliny. V dalším textu bude užíváno obecně používané označení aminokyselina.



Obr. 2.1a: 4-propylprolin



Obr. 2.1b: prolin

2.1.1 Vlastnosti prolinu a 4-propylprolinu

Prolin ze řadí mezi nepolární aminokyseliny. Jeho polarita je dána pouze amino skupinou a karboxylovou skupinou, zbytek sloučeniny má nepolární charakter. U 4-propylprolinu je nepolární charakter ještě umocněn přítomností propylu.

V reálných vzorcích byl 4-propylprolin stanovován o koncentraci maximálně 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, k přípravě roztoků standardu 4-propylprolinu byly použity roztoky o koncentraci max. 1 mg ml^{-1} . Tyto hodnoty se nacházejí v oblasti dobré rozpustnosti 4-propylprolinu, kterou lze na základě strukturní podobnosti odvodit z rozpustnosti prolinu, která je ve vodě je 162 mg ml^{-1} [7]. Lze odhadnout, že rozpustnost 4-propylprolinu nebude řádově nižší.

2.1.2 Přehled analytických metod stanovení 4-propylprolinu a prolinu

Analytická metoda stanovení 4-propylprolinu není v chemické literatuře dosud popsána. Proto bylo při vývoji metody použito poznatků o stanovení látky velice podobné a dobře v literatuře popsané, tedy prolinu.

Separace prolinu od matrice

Aby bylo možné stanovit 4-propylprolin v matrici kultivačního média, je nutné analyt od matrice separovat. V literatuře se můžeme setkat se separací prolinu založenou na elektroforéze [8,9], plynové chromatografii [10], iontově výměnné chromatografii [11,12] a reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Stanovení elektroforézou je v prvním případě [8] založeno na derivatizaci fluorscaminem za vzniku derivátů, které sice nevykazují fluorescenci, ale je možné je detekovat v UV oblasti. V druhém případě [9] je prolin s využitím tris(2,2'-bipyridyl)-ruthenia(II) detekován elektrochemiluminiscencí v lidské moči.

Plynová chromatografie může být použita po předchozí derivatizaci propylchlorformiátem s následnou detekcí pomocí hmotnostní spektrometrie (identifikace píku) a s plamenově ionizační detekcí (kvantifikace píku). Prolin je stanovován v ovoci [10].

Hanko a kol. [11] použili ke stanovení prolinu v buněčných kulturách iontově výměnnou chromatografii s pulzní amperometrickou detekcí. Stejná metoda byla využita ke stanovení prolinu ve víně [12].

Nejvíce je pro stanovení prolinu využívána reverzní HPLC s detekcí například ampérometrickou [13] nebo elektrochemiluminiscenční pomocí tris(2,2'-bipyridyl)-ruthenia (II) [14] nejčastěji však s UV a fluorescenční detekcí derivatizovaného prolinu. Samotný prolin totiž nevykazuje fluorescenci a absorpce v UV oblasti je slabá. Je sice popsáno spektrofotometrické stanovení prolinu ve vodě bez předchozí derivatizace [15] tato metoda však není aplikovatelná na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, neboť při vlnové délce absorpčního maxima prolinu (191 nm) silně absorbují rozpouštědla běžně používaná v chromatografii. Pro snazší detekci se prolin derivatizuje za vzniku derivátu, který buď fluoreskuje nebo dostatečně absorbuje v UV případně ve viditelné oblasti. Derivatizace může být provedena buď před separací

prolinu (tzv. předkolonová derivatizace) nebo až po separaci prolinu (tzv. postkolonová derivatizace). Existuje celá řada činidel vhodných pro derivatizaci prolinu, jejich přehled včetně plných názvů je uveden v tab. 2.1.

Tab. 2.1: Přehled činidel pro derivatizaci prolinu

UV detekce	
zkratka	název
PITC	phenylisothiokyanát
DEMM	diethyl ethoxymethylenemalonát
DNP	2,4-dinitrofluorbenzen
FDNDEA	N,N-diethyl-2,4-dinitro-5-fluoroanilin
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzen
FDNPAA	1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanin amid
ninhydrin	ninhydrin
fluorescenční detekce	
zkratka	název
OPA	<i>o</i> -phtaldialdehyd
DNS-Cl	1-dimethylaminonaphtalen-5-sulphonyl chlorid
AQC	6-aminoquinolyl-N-hydroxyscicinimidyl karbamát
FMOC	9-fluorenyl methylechloroformát
NBD-Cl	4-chloro-7-nitrobenzofurazan
DNBD-Cl	7-chloro-4,6-dinitrobenzofurazan
DMS-Cl	4-(5,6-dimethoxy-2-phtalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chlorid

Derivatizační činidla vhodná pro UV (VIS) detekci prolinu

Derivatizaci pomocí PITC popisuje publikace [16], která se primárně věnuje analýze asparaginu a glutaminu ve fyziologickém roztoku, ovšem popisuje i stanovení prolinu touto metodou. PITC je také použito jako derivatizační činidlo při analýze prolinu v biologických vzorcích [17]. Článek autorů Bernal a kol. [18] srovnává dvě derivatizační metody (FMOC, AQC – viz dále) s derivatizací pomocí DEMM v medu. Činidlo DEMM využívá i Alaiz a kol. [19]. Další možností, jak derivatizovat prolin, je činidlo DNP [20]. V publikaci [21] autoři srovnávají sedm derivatizačních činidel PITC, FDNDEA, FDNB, FDNPAA a další tři fluorescenční činidla (viz dále) pro stanovení

prolinu v biologických vzorcích. Konečně k tradičním derivatizačním činidlům patří ninhydrin [22,23], který poskytuje barevné deriváty. Ve viditelné oblasti absorbují i deriváty aminokyselin s DNBD-Cl [24].

Derivatizační činidla vhodná pro fluorescenční detekci prolinu

Analýza prolinu založená na derivatizaci fluorescenčními činidly je v chemické literatuře je popisována nejčastěji. Mezi velmi rozšířené činidlo patří OPA [22,23,25-29]. Ve studovaných pracích se prolin stanovuje v biologických vzorcích [21,30,29], moštu a víně [25,26]. Dalším činidlem je DNS-Cl [31,32]. V práci [32] jsou aminokyseliny včetně prolinu analyzovány v bakteriálních kultivacích. Stanovení prolinu a dalších látek v biologických vzorcích, jako například lidské sérum, je popsáno v publikaci [33], k derivatizaci je použito činidlo DMS-Cl. Derivatizaci pomocí FMOC popisují práce [21,34,35] a již zmíněná práce [18], která srovnává DEMM (viz výše) s FMOC a dalším fluorescenčním činidlem – AQC pro analýzu aminokyselin v medu. AQC byl použit také pro derivatizaci prolinu a dalších aminokyselin v dětské výživě [36]. Carisano a kol. [37] publikuje derivatizaci prolinu činidlem NBD-Cl v ovocném džusu. Za pozornost stojí také derivatizace s DBS-Cl [38] nebo práce popisující derivatizaci s BCEOC v matrici hovězího séra [39].

2.1.3 Výběr způsobu derivatizace a detekce

4-propylprolin byl separován metodou HPLC. Při rozhodování o způsobu detekce (UV nebo fluorescence) sehrál hlavní roli požadavek na vysokou citlivost metody. Proto byla vybrána detekce fluorescenční, která je navíc velmi selektivní.

Při konkrétním výběru fluorescenčního derivatizačního činidla je třeba vzít v úvahu celou řadu jejich vlastností. V následujícím textu jsou podrobněji rozebrána nejužívanější fluorescenční činidla, která jsou vhodná pro derivatizaci 4-propylprolinu.

OPA reaguje pouze s primární amino skupinou, proto je nutné předřadit před derivatizaci krok, který převede sekundární amino skupinu 4-propylprolinu na primární. K tomu je třeba zvolit vhodné oxidační činidlo. Používá se chloramin-T [28,29] nebo NaOCl [27,23]. Chloramin-T je slabší oxidační činidlo, vyžaduje reakci za zvýšené teploty po několik minut. NaOCl je oproti tomu tak silným oxidačním činidlem, že

reaguje i s OPA a dalšími nutnými složkami derivatizační reakční směsi [23]. OPA s primární aminoskupinou reaguje pouze v přítomnosti merkaptoskupiny, obvykle se využívá merkaptoethanol [27-29]. Výhodou OPA je velmi rychlá derivatizace (méně než 1 minuta), poměrně vysoká reprodukovatelnost dané metody, dobrá citlivost i selektivita. OPA neposkytuje vedlejší produkty [21], samotná nevykazuje fluorescenci [23]. Hlavní nevýhodou je nestabilita OPA derivátů [21].

DNS-Cl reaguje s primárními i sekundárními aminokyselinami, doba derivatizace není delší než 10 minut [32]. Činidlo samo o sobě nefluoreskuje. Nevýhodou je vznik vedlejších produktů při derivatizaci [21]. Podle většiny prací jsou deriváty s DNS-Cl stabilní [21,32,31], pouze v jedné práci je tento fakt zpochybněn [36]. Citlivost této metody je v porovnání s ostatními fluorescenčními činidly nižší [21]. DNS-Cl není podle jedné z publikací [40] vhodný pro stanovení nízkých koncentrací aminokyselin ve složité matici. Podobné charakteristiky platí i pro DBS-Cl.

FMOC reaguje s primárními i sekundárními aminokyselinami, přičemž derivatizace proběhne do 5 minut a deriváty jsou stabilní [21,34,35]. Hlavní nevýhodou je nutnost použití velkého nadbytku činidla, které musí být z reakční směsi odstraněno. Důvodem je vysoká fluorescence samotného FMOC. Tento krok vyžaduje extrakci pentanem [34] nebo jinými sloučeninami [35]. Ostatní vlastnosti jako reprodukovatelnost, citlivost a selektivita jsou v rámci fluorescenčních činidel průměrné [21].

AQC je nové, moderní derivatizační činidlo. Hlavní nevýhodou tohoto derivatizačního činidla je jeho vysoká cena. Mezi jeho výhody patří schopnost reagovat s primárními i sekundárními aminokyselinami. Reakce trvá 10 minut, vznikají stabilní deriváty [36]. Citlivost je srovnatelná s FMOC [18].

NBD-Cl reaguje s primárními, ale především se sekundárními aminokyselinami. Problémem metody je nízká reprodukovatelnost, vedlejší produkty vznikající při derivatizaci a nižší citlivost [37].

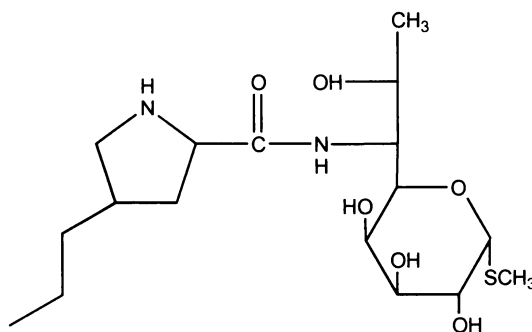
Na základě zvážení výše uvedených výhod a nevýhod derivatizačních činidel byl pro derivatizaci 4-propylprolinu vybrán OPA. Mezi hlavní důvody patří vysoká citlivost a reprodukovatelnost metody a také počet popsanych metod aplikovaných na vzorky se složitou maticí (biologické vzorky).

Pro analýzu 4-propylprolinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis* byla zvolena vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí s využitím

OPA jako derivatizačního činidla. Základem vývoje této analytické metody se stala publikace Coopera [28].

2.2 N-demethyllinkomycin

Molekula N-demethyllinkomycinu (obr. 2.2) je tvořena sacharidovou částí (tato část je identická se sacharidovou částí linkomycinu) a aminokyselinovou částí (ta se od aminokyselinové části linkomycinu liší).



Obr. 2.2: N-demethyllinkomycin

2.2.1 Vlastnosti N-demethyllinkomycinu

N-demethyllinkomycin má díky přítomnosti sacharidové části v molekule polární charakter. Velmi důležitá je přítomnost sekundárního dusíkového atomu na aminokyselinové části. Tím se N-demethyllinkomycin liší od linkomycinu, který má tento dusíkový atom terciální.

V reálných vzorcích byl N-demethyllinkomycin stanovován o koncentraci maximálně $100 \mu\text{g ml}^{-1}$, k přípravě roztoků standardu N-demethyllinkomycinu byly použity roztoky o koncentraci max. $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$. Tyto hodnoty se nacházejí v oblasti dobré rozpustnosti N-demethyllinkomycinu, kterou lze na základě strukturní podobnosti odvodit z rozpustnosti linkomycinu, která je ve vodě $0,93 \text{ mg ml}^{-1}$ [41]. Lze odhadnout, že rozpustnost N-demethyllinkomycinu nebude řádově nižší.

2.2.2 Přehled analytických metod stanovení N-demethyllinkomycinu a linkomycinu

V současné době není popsána metoda stanovení N-demethyllinkomycinu. Z chemické struktury vyplývají pro analýzu N-demethyllinkomycinu dva možné přístupy.

První možností je využití podobnosti analytu s linkomycinem. Pro stanovení N-demethyllinkomycinu tak lze aplikovat některou metodu popisující stanovení linkomycinu.

Druhou možností je využití sekundárního dusíkového atomu N-demethyllinkomycinu. V tom případě lze vyjít z metod stanovení popsaných pro prolin.

Stanovení linkomycinu

Pro stanovení linkomycinu byly popsány metody plynové chromatografie [42], reverzní vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí, elektrochemickou detekcí nebo hmotnostní detekcí (viz níže).

Reverzní HPLC s UV detekcí využili např. Moats a kol. [43] ke stanovení linkomycinu v mléku a tkáních nebo Platzer a White [44], kteří stanovovali linkomycin a klindamycin v tabletách. Orwa a kol. [45] stanovili linkomycin na reverzní HPLC s využitím iontově párového činidla a UV detekce. Douša a kol. [46] analyzovali linkomycin v krmivech pomocí kapalinové chromatografie s UV a MS/MS detekcí. V nově publikované práci [4] je linkomycin stanovován v matici kultivačního média na reverzní HPLC a UPLC s UV detekcí. V této metodě je linkomycin z kultivačního média nejprve extrahován a zakoncentrován extrakcí na pevné fázi.

Stanovení linkomycinu kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí bylo popsáno v matici kravského mléka [47], zvířecích tkáních [48], svalech, játrech a ledvinách prasat [49] a v medu [50].

Stanovení prolinu

Metody stanovení prolinu byly podrobně popsány dříve (kapitola 2.1).

2.2.3 Výběr způsobu derivatizace a detekce

Při výběru metody pro stanovení N-demethyllinkomycinu je nezbytné počítat se složitou maticí kultivačního média. Stanovení linkomycinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis* popisuje práce Olšovské a kol. [4]. Případnou aplikací této metody je možnost stanovení N-demethyllinkomycinu a linkomycinu vedle sebe.

Při aplikaci metody, která byla vyvíjena pro stanovení 4-propylprolinu, by bylo možné stanovit N-demethyllinkomycin a 4-propylprolin v jedné analýze.

Konečně lze pro stanovení N-demethyllinkomycinu zvolit metodu pro stanovení methylthiolinkosamidu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis* [6]. Tato metoda je založena na stejném principu jako metoda stanovení prolinu. Jako derivatizační činidlo byl použit NBD-Cl. Při aplikaci této metody by bylo možné stanovit methylthiolinkosamid a N-demethyllinkomycin vedle sebe.

Pro analýzu N-demethyllinkomycinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis* byla využita ultraúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí (na základě publikace Olšovské a kol. [4]) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí s využitím NBD-Cl jako derivatizačního činidla. Metoda byla vyvíjena na základě publikace Yurka a kol. [6].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie a standardy

3.1.1 Chemikálie

Acetonitril (CH_3CN) – HPLC gradient grade, Mallinckrodt Baker, filtrován přes membránový filtr Fluoropore 0,2 μm , Millipore

Borohydrid sodný (NaBH_4) – min. 98 %, Janssen chimica, Belgie

Dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý (KH_2PO_4) – min. 99,0 %, Sigma-Aldrich

Dimethylsulfoxid (DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$) – 99,5 % (GC), Sigma-Aldrich

o-Ftaldialdehyd (OPA, $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$) – HPLC, Sigma-Aldrich

Hydroxid amonný (NH_4OH) – A. C. S. reagent, Sigma-Aldrich

Hydroxid draselný (KOH) – p.a., Sigma-Aldrich

Hydroxid lithný monohydrát ($\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$) – p.a., Sigma-Aldrich

Hydroxid sodný (NaOH) – min. 98 %, Sigma-Aldrich

Chloramin-T (*N*-chlor-*p*-toluensulfonamid sodný, $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNO}_2\text{SNa}$) – Sigma-Aldrich

4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl, $\text{C}_6\text{H}_2\text{ClN}_3\text{O}_3$) – HPLC, Sigma-Aldrich

Kyselina trihydrogenboritá (H_3BO_3) – min. 99,5 %, Sigma-Aldrich

2-Merkaptoethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$), Sigma-Aldrich

Methanol (CH_3OH) – HPLC gradient grade, Merck

Octová kyselina (CH_3COOH) – HPLC grade, Sigma-Aldrich

Voda – redestilovaná voda filtrovaná přes membránový filtr Durapore 0,45 μm , Millipore

Voda byla skladována v tmavých lahvích při laboratorní teplotě maximálně 24 hodin, v lednici (4 °C) maximálně 5 dní. Ostatní chemikálie byly skladovány dle pokynů výrobce.

Roztoky borohydridu sodného, chloraminu-T, 4-chloro-7-nitrobenzofurazanu a *o*-ftaldialdehydu byly připravovány denně čerstvé.

Roztoky hydroxidu sodného, draselného a lithného byly používány 14 dní a uchovávány při 4 °C.

3.1.2 Standardy

4-propylprolin byl připraven doc. Liborem Havlíčkem v Izotopové laboratoři Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, postupem vycházejícím z publikace [51]. Struktura a čistota byly potvrzeny hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí. 4-propylprolin byl skladován při teplotě -24 °C. Roztok 4-propylprolinu byl připraven navážením asi 1 mg látky přesně a rozpuštěním ve vodě nebo v matrici na koncentraci 1 mg ml⁻¹. Roztoky o nižší koncentraci byly připraveny ředěním tohoto roztoku. Pro přidání standardu 4-propylprolinu do reálných vzorků byl použit roztok 4-propylprolinu ve vodě o koncentraci 1 mg ml⁻¹.

N-demethylkomycin byl připraven doc. Liborem Havlíčkem v Izotopové laboratoři Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, postupem vycházejícím z publikace [52]. Struktura a čistota byly potvrzeny hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí. N-demethylkomycin byl skladován při teplotě 4 °C. Roztok N-demethylkomycinu byl připraven navážením asi 0,5 mg látky přesně a rozpuštěním ve vodě nebo v matrici na koncentraci 0,5 mg ml⁻¹. Roztoky o nižší koncentraci byly připraveny ředěním tohoto roztoku. Pro přidání standardu N-demethylkomycinu do reálných vzorků byl použit roztok N-demethylkomycinu ve vodě o koncentraci 0,5 mg ml⁻¹.

Roztoky standardů byla skladovány při 4 °C a používány 5 dní.

3.2 Reálné vzorky

Reálné vzorky byly připraveny pracovníky Laboratoře biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky. Proto je v následujícím textu uveden pouze stručný popis jejich přípravy.

3.2.1 Kmen *Streptomyces lincolnensis* a jeho genetická modifikace

Všechny experimenty byly provedeny s kmenem *Streptomyces lincolnensis* DSM 40355.

Propylprolin a N-demethyllinkomycin byly stanovovány v kultivačním médiu typového kmene (wild type, WT) *Streptomyces lincolnensis* a geneticky upravené *Streptomyces lincolnensis*.

Typový kmen označuje kmen, u něhož nebyly provedeny genetické modifikace v genovém shluku zodpovědném za produkci linkomycinu, je tedy jeho přirozeným producentem.

U geneticky upravené *Streptomyces lincolnensis* byl studovaný gen inaktivován metodou REDIRECT technology for PCR targeting [53].

3.2.2 Podmínky kultivace

Spory *Streptomyces lincolnensis* 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 µl 2,5 M MgCl₂) a kultivovány 30 h při 30 °C (očkovací kultura). Médium AVM (25 ml), které obsahovalo kvasniční extrakt 2 g l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 2 g l⁻¹, CaCO₃ 5 g l⁻¹, NaCl 2 g l⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g l⁻¹, FeSO₄·7H₂O 0,05 g l⁻¹, ZnSO₄·7H₂O 0,05 g l⁻¹, MnSO₄·7H₂O 0,05 g l⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0,1 g l⁻¹, glukóza 5 g l⁻¹, bylo naočkováno 5 % očkovací kultury a bylo kultivováno 120 h při 30 °C. Kultivace byla zpracována (viz dále) a analyzována.

3.2.3 Příprava, přehled a skladování reálných vzorků

V tab. 3.1 je uvedeno označení reálných vzorků, informace o genu a způsob, jakým byla kultivace zpracována.

Při zpracování kultivace způsobem 1 (viz tab. 3.1) byl analyzovaným vzorkem supernatant vzniklý centrifugací mycelia (4000 rpm, 4 °C, 10 min). To znamená, že bylo analyzováno kultivační médium. Při způsobu 2 bylo mycelium centrifugováno (4000 rpm, 4 °C, 10 min), promyto vodou, resuspendováno ve vodě o objemu shodném s objemem média. Následně byly buňky mycelia rozbity ultrazvukem (6 pulzů po 30 s, 50 W, mezi jednotlivými pulzy přestávka 30 s). Tato suspenze byla centrifugována (4000 rpm, 4 °C, 10 min). Supernatant byl analyzován. Tímto způsobem byl analyt stanovován v buňkách. Způsobem 3 byly buňky mycelia rozbity ultrazvukem (6 pulzů po 30 s, 50 W, mezi jednotlivými pulzy přestávka 30 s) přímo v médiu a poté centrifugovány při 4000 rpm při teplotě 4 °C. Supernatant byl analyzován. Tímto způsobem byl analyt stanovován v médiu i v buňkách mycelia.

Tab. 3.1: Přehled reálných vzorků

označení vzorku	inaktivovaný gen	zpracování kultivace*
WT1	-	1
N1	lmb N	1
N2	lmb N	2
N12	lmb N	3
D1	lmb D	1
X12	lmb X	3
B ₂ 1	lmb B ₂	1

* 1- stanovení analytu v kultivačním médiu

2- stanovení analytu v buňkách

3- stanovení analytu v buňkách i kultivačním médiu

Takto připravené vzorky byly skladovány při teplotě -24 °C.

3.3 Použité přístroje a metody

3.3.1 Přístroje

HPLC analýzy:

Analýzy byly provedeny na přístroji HPLC systém (Waters): pumpa 600 Controller, autosampler 717 a fluorescenční detektor 2475. K vyhodnocení byl použit program Millennium 32 (Waters). Vzorokly byly separovány na koloně Luna C 18; 5 μm ; 100 Å; 250 \times 4,6 mm; 00G-4252-E0 (Phenomenex).

Další technická instrumentace:

Měření pH: pH metr pH 538 (WTW Měřicí a analytická technika).

Úprava vzorku za zvýšené teploty: Vodní lázeň U-4 (MLW) s teploměrem Testo 925 (Testo).

Analytické váhy: AE 163 (Mettler Toledo).

Centrifuga: Minispin (Eppendorf), vzorky centrifugovány při otáčkách 13400 rpm po dobu 5 minut.

Pipetování: Sada automatických nastavitelných pipet - 100, 200, 1000 μl (Gilson), 10 μl (Hamilton), 5 ml (Socorex).

3.3.2 Příprava pufrů

Fosforečnan draselný (různé koncentrace). Příslušné množství dihydrogenfosforečnanu draselného bylo naváženo a rozpuštěno ve vodě. Roztok byl titrován nasyceným roztokem hydroxidu draselného na požadované pH. Pufr byl přefiltrován přes membránový filtr nitrocelulozový GSWP04700 (Millipore) a bylo k němu přidáno 9,1 % acetonitrilu.

Boritan sodný (400 mmol l^{-1}). Navážené množství kyseliny trihydrogenborité (1,237 g) bylo rozpuštěno ve vodě (50 ml). Roztok byl titrován nasyceným roztokem hydroxidu sodného na požadované pH.

Boritan sodný (200 mmol l^{-1}) byl připraven naředěním 400 mmol l^{-1} boritanu sodného vodou v objemovém poměru 1:1. Roztok byl titrován nasyceným roztokem hydroxidu sodného na požadované pH.

3.3.3 Zpracování dat a matematické výpočty

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickým postupy [54]. Výsledky chromatografických měření jsou aritmetické průměry nejméně tří měření. Kalibrační křivky byly získány metodou lineární regrese s vyhodnocením všech souvisejících parametrů (korelační a determinační koeficient, směrodatná odchylka lineární regrese).

Limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ) byly vypočítány podle vztahů

$$\text{LOD} = \frac{3s_{y/x}}{a} \quad (3.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10s_{y/x}}{a} \quad (3.2)$$

kde $s_{y/x}$ je směrodatná odchylka lineární regrese a a je směrnice lineární regrese.

K tvorbě grafů a k výpočtům byly použity programy Microcal Origin 6.1 (Microcal Software) a Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation).

Správnost metody (x) byla vypočítána podle rovnice

$$x = \frac{c_{real}}{c_{nom}} \cdot 100$$

kde c_{real} je naměřená koncentrace c_{nom} je nominální (správná) koncentrace.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Stanovení 4-propylprolinu

Jak již bylo uvedeno v teoretické části, bylo při vývoji metody stanovení 4-propylprolinu využito podobnosti molekuly 4-propylprolinu s prolinem. V kapitole 2.1.2 je uveden výčet metod stanovení prolinu a důvod, proč byla jako původní předloha stanovení 4-propylprolinu vybrána právě metoda Coopera [28], kde je prolin stanoven metodou HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci činidlem OPA.

Modifikací této metody byla vyvinuta nová metoda vhodná pro stanovení 4-propylprolinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis*.

4.1.1 Chromatografické podmínky a podmínky detekce

Metodou 1 je označena původní chromatografická metoda popsaná v publikaci [28], ostatní metody byly vytvořeny postupnou úpravou.

Metoda 1. 20 μl derivatizovaného vzorku bylo naneseno na analytickou kolonu Ultrasphere ODS (150 \times 4,6 mm I.D., 5 μm) a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: fosforečnan/propionát:acetonitril:voda 40:8:52 (v/v/v), kde roztok fosforečnan/propionát byl připraven smícháním 250 mM kyseliny propionové s 350 mM Na_2HPO_4 1:1 (v/v) s následnou úpravou pH roztoku na hodnotu 6,5 titrací 4 M hydroxidem sodným; fáze B: acetonitril:methanol:voda 30:30:40 (v/v/v)). Počáteční podmínky gradientové eluce byly 20 % B po dobu 0,5 min konstantní, poté gradient lineárně rostl 5 min na hodnotu 100 % B, kde byl konstantní do 8. minuty analýzy. Kolona byla dále převedena do 0 % B za 0,5 min a poté ekvilibrována při 20 % B. Průtok mobilní fáze během celé analýzy byl 2,5 ml ml^{-1} . Vzorky byly detekovány fluorescencí (excitace 240 nm, emise 417 nm).

Metoda 2. Při reprodukci výše uvedených podmínek docházelo při průtoku mobilní fáze 2,5 ml min^{-1} k výraznému zvýšení zpětného tlaku na koloně. Proto byl průtok snížen a následně upraven celý gradient. Dále byla použita jiná chromatografická

kolona (původně popsaná kolona nebyla k dispozici) a některé složky mobilní fáze byly nahrazeny jinými.

Kyselina propionová v mobilní fázi byla nahrazena kyselinou octovou, místo hydrogenfosforečnanu sodného byl použit dihydrogenfosforečnan draselný (pH bylo upraveno 1 M hydroxidem draselným). 25 μ l derivatizovaného vzorku bylo nanášeno na analytickou kolonu Luna C 18 (250 \times 4,6 mm I.D., 5 μ m, 100 Å) a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: fosforečnan/acetát:acetonitril:voda 40:8:52 (v/v/v), kde roztok fosforečnan/acetát byl připraven smícháním 250 mM kyseliny octové a 350 mM KH_2PO_4 1:1 (v/v) s následnou úpravou pH na hodnotu 6,5 titrací 1 M hydroxidem draselným; fáze B: acetonitril:methanol:voda 30:30:40 (v/v/v). Počáteční podmínky gradientové eluce byly 20 % B po dobu 1 min konstantní, poté gradient lineárně rostl 10 min na hodnotu 100 % B, kde byl konstantní do 16. minuty analýzy. Kolona byla dále převedena do 0 % B za 1 min a poté ekvilibrována při 20 % B. Průtok mobilní fáze během celé analýzy byl 1,25 ml min⁻¹. Gain fluorescenčního detektoru byl nastaven na hodnotu 10.

Metoda 3. Ve snaze zjednodušit komplikovanou mobilní fázi byla navržena nová dvousložková mobilní fáze (fáze A: 2,2 mM dihydrogenfosforečnan draselný upravený 1 M hydroxidem draselným na pH 6,9; fáze B: acetonitril), jejímž použitím bylo dosaženo stejně účinné separace. Tomu byla přizpůsobena i nová gradientová eluce, jejíž počáteční podmínky byly 20 % B po dobu 1 min konstantní, poté gradient lineárně rostl na hodnotu 100 % B za 16 min, kde byl konstantní do 21 min analýzy. Před další analýzou byla kolona ekvilibrována při 20 % B.

Metoda 4. Jelikož se v různých publikacích rozcházejí údaje o vlnové délce excitace a emise při fluorescenční detekci, byly tyto hodnoty přetestovány. S vlnovými délkami 240/417 nm (excitace/emise) [28] byly srovnány hodnoty 340/450 nm [23,29] a 336/425 nm [30]. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.1.

Tab. 4.1: Vliv vlnových délek excitace a emise na fluorescenci derivatizovaného 4-propylprolinu

100 μl 4-propylprolinu o koncentraci 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin T, 300 mM NaBH_4 , pH 10, 60 $^\circ\text{C}$, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 3

λ (nm) excitace/emise	A, PPL ($10^4 \mu\text{V s}$)	A, PPL* (%)
240/417	812	100
340/450	1031	127
336/425	1095	135

*jako základ 100 % byla použita plocha píku získaná za původních podmínek 240/417 nm [28]

Nejlepší detekce bylo dosaženo při excitaci 336 nm a emisi 425 nm, proto byly tyto parametry změněny na uvedené hodnoty a dále používány.

Metoda 5. Elučním gradientem metody 4 nebylo dosaženo úplné separace píku 4-propylprolinu od matrice, proto byl modifikován do následující podoby. Počáteční podmínky gradientové eluce byly 30 % B po dobu 1 min konstantní, poté gradient lineárně rostl 24 min na hodnotu 100 % B, následoval pokles na 70 % B lineárně za 2 min. Před další analýzou byla kolona ekvilibrována při 30 % B. Pro gain fluorescenčního detektoru byla zvolena hodnota 100.

Metoda 5 je konečnou chromatografickou metodou pro stanovení 4-propylprolinu.

4.1.2 Oxidace a derivatizace 4-propylprolinu

V publikaci [28] je prolin oxidován a derivatizován následujícím způsobem. 200 μl 10 mM roztoku chloraminu-T v 400 mM Na_3BO_3 (pH 8,5) a DMSO 4:1 (v/v) bylo přehřáto v mikrozkuhavce ve vodní lázni o teplotě 60 $^\circ\text{C}$ po dobu 1 min. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 50 μl vzorku, roztok byl promíchán a zahříván 1 min při 60 $^\circ\text{C}$. Ke směsi bylo přidáno 200 μl 300 mM roztoku NaBH_4 v 600 mM LiOH, roztok byl promíchán a zahříván 10 min při 60 $^\circ\text{C}$. Poté byl do mikrozkuhavky přidán 1 ml derivatizačního činidla (směs 5 mg OPA rozpuštěného ve 100 μl acetonitrilu a 900 μl 200 mM Na_3BO_3 , pH 8,5 a 4 μl mertkaptoethanolu) a vzorek byl ihned dávkován na kolonu. Analýza byla provedena metodou 1.

Z důvodu snížení spotřeby derivatizačního činidla a zvýšení detekčního limitu byl způsob oxidace a derivatizace upraven následovně.

K oxidaci a derivatizaci byly redukovány objemy reagentů (100 μl chloraminu-T, 100 μl NaBH_4 , 25 μl vzorku), 22,5 μl oxidační směsi bylo smícháno s 50 μl derivatizačního činidla. Hodnota pH roztoku Na_3BO_3 použitého k rozpuštění chloraminu-T a OPA byla 10,0. Vzorky byly měřeny metodou 2.

Pro zvýšení detekčního limitu 4-propylprolinu bylo modifikováno několik kroků v postupu oxidace a derivatizace 4-propylprolinu. Byl studován vliv koncentrace chloraminu-T, borohydridu sodného a OPA, dále vliv teploty reakce, pH roztoku Na_3BO_3 , doby oxidace a množství přidávaného vzorku do reakce na výtěžnost reakce.

4.1.2.1 Vliv koncentrace chloraminu-T a borohydridu sodného na oxidaci 4-propylprolinu

Z důvodu možného pozitivního vlivu na oxidační reakci byl studován vliv zakonzentrování oxidačních činidel. Zmenšením objemu reakční směsi by navíc došlo ke zvýšení konečné koncentrace výsledného produktu reakce v celkovém objemu. Vliv koncentrace obou roztoků na oxidaci byl testován současně. K pokusu byly použity roztoky chloraminu-T o koncentracích 10, 20 a 30 mmol l^{-1} a borohydridu sodného o koncentracích 300, 600 a 1200 mmol l^{-1} . Výsledky experimentu jsou uvedeny v tab. 4.2.

Tab. 4.2 Vliv koncentrace chloraminu-T a borohydridu sodného na oxidaci 4-propylprolinu

25 μl vzorku 4-propylprolinu o koncentraci 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: pH 10, 60 $^\circ\text{C}$, 10 min, 5 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 3

chloramin-T		borohydrid sodný		reakční směs*	A, PPL ($10^4 \mu\text{V s}$)	A, PPL** (%)
c (mmol l^{-1})	V (μl)	c (mmol l^{-1})	V (μl)	V (μl)		
10	100	300	100	22,5	208	100
20	50	600	50	12,5	198	95
40	25	1200	25	7,5	172	83

* objem reakční směsi, ke které bylo přidáno 50 μl derivatizačního činidla

** jako základ 100 % byla použita plocha píku získaná za původních podmínek – při použití 10 mM chloraminu-T a 300 mM borohydridu sodného

Z výsledků je patrné, že zakonzentrováním roztoků chloraminu-T a borohydridu sodného se plocha píku a tedy koncentrace oxidovaného a následně derivatizovaného produktu snižuje.

Koncentrace roztoků chloraminu-T a borohydridu sodného pro oxidaci 4-propylprolinu nebyla změněna.

4.1.2.2 Vliv koncentrace OPA na derivatizaci 4-propylprolinu

Přidáním derivatizačního činidla k reakční směsi dojde k více než trojnásobnému naředění vzorku. Použití koncentrovanějšího roztoku derivatizačního činidla by mohlo vést ke snížení detekčního limitu 4-propylprolinu. Proto byl studován vliv koncentrace derivatizačního činidla na plochu píku derivátu 4-propylprolinu. Koncentrace OPA 5 mg ml⁻¹ byla srovnána s koncentracemi 25 a 50 mg ml⁻¹. Pro zlepšení rozpustnosti OPA v koncentrovanějších roztocích byl při tomto pokusu OPA rozpuštěn v acetonitrilu a 200 mM NaBO₃, pH 10 v objemovém poměru 1:1. Objem přidávaného merkptoethanolu nebyl změněn (byl zachován poměr mezi látkovým množstvím OPA a merkptoethanolu). Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.3.

Tab. 4.3: Vliv koncentrace OPA na derivatizaci 4-propylprolinu

25 µl vzorku 4-propylprolinu o koncentraci 200 µg ml⁻¹; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin T, 300 mM NaBH₄, pH 10, 60 °C, 10 min; HPLC analýza: metoda 3

OPA	Derivatizační činidlo	Reakční směs [*]	A, PPL (10 ⁴ µV s)	A, PPL ^{**} (%)
c (mg ml ⁻¹)	V (µl)	V (µl)		
5	50	22,5	232	100
25	10	22,5	375	162
50	10	45,0	523	226

^{*}objem reakční směsi po oxidaci, která byla použita k derivatizaci

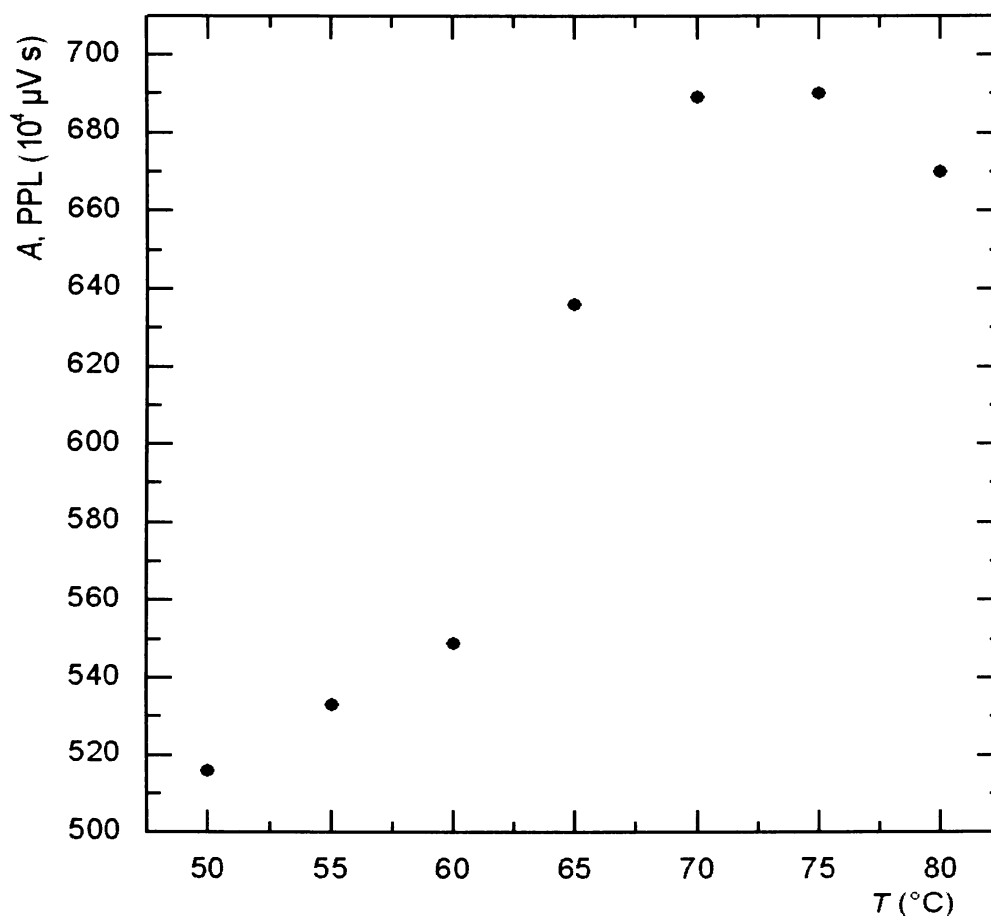
^{**}jako základ 100 % byla použita plocha píku získaná za původních podmínek – 5 mg ml⁻¹ OPA

Při použití desetkrát koncentrovanějšího derivatizačního činidla vzrostla plocha píku 4-propylprolinu 2,26 krát.

Na základě těchto výsledků byl dále používán OPA o koncentraci 50 mg ml^{-1} : $100 \mu\text{l}$ derivatizačního činidla bylo připraveno rozpuštěním 5 mg OPA v $50 \mu\text{l}$ acetonitrilu a $50 \mu\text{l}$ 200 mM boritanu sodného ($\text{pH } 10$), do směsi byly přidány $4 \mu\text{l}$ merkaptoethanolu.

4.1.2.3 Vliv teploty na oxidaci 4-propylprolinu

Teplota patří mezi hlavní faktor ovlivňující chemickou reakci. Optimální teplota oxidace 4-propylprolinu byla sledována v intervalu od $50 \text{ }^\circ\text{C}$ do $80 \text{ }^\circ\text{C}$ po $5 \text{ }^\circ\text{C}$. Výsledky experimentu jsou zaznamenány v grafu na obr. 4.1.



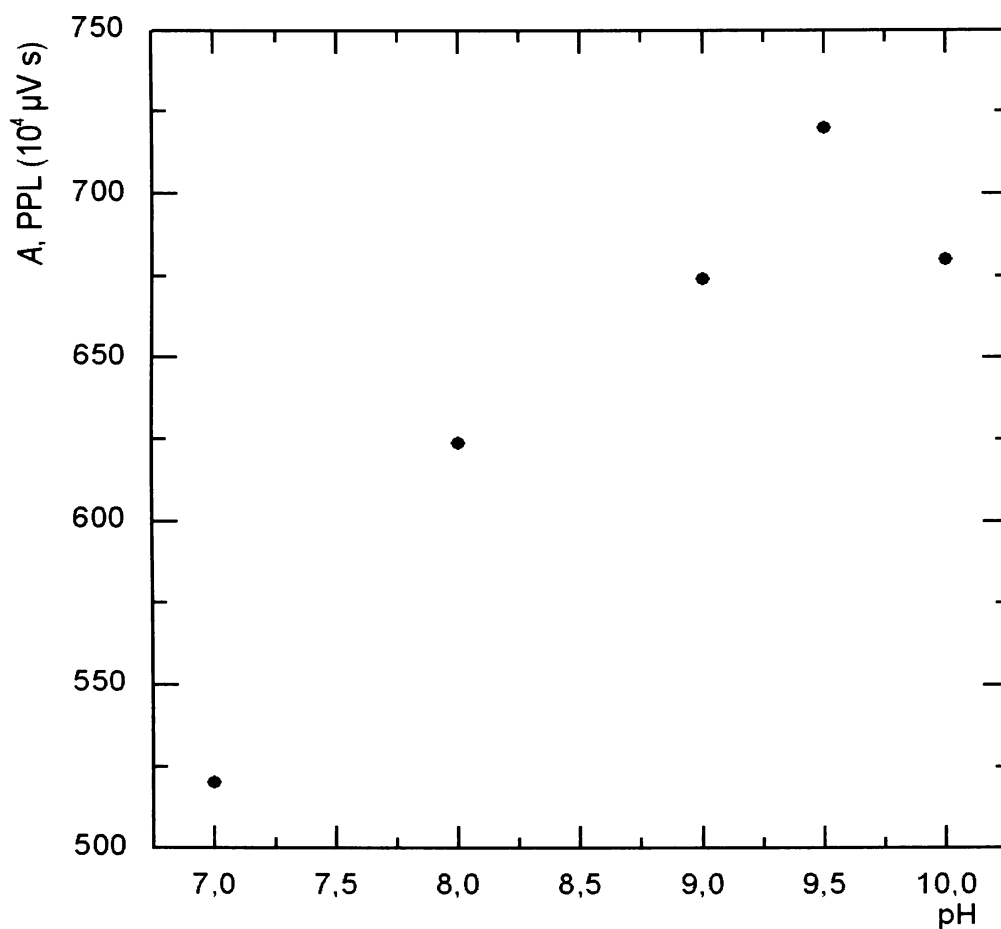
Obr. 4.1: Závislost výtěžku oxidace 4-propylprolinu na její teplotě

$25 \mu\text{l}$ vzorku 4-propylprolinu o koncentraci $200 \mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10 mM chloramin-T, 300 mM NaBH_4 , $\text{pH } 10$, 10 min , 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 3

Z výsledků pokusu vyplývá, že se koncentrace derivátu 4-propylprolinu zvyšuje s rostoucí teplotou do hodnoty 70 °C. Při vyšších teplotách koncentrace derivátu stagnuje, nad 75 °C dokonce klesá. Jako optimální hodnota byla zvolena teplota 70 °C a byla použita v dalších experimentech.

4.1.2.4 Vliv pH na oxidaci a derivatizaci 4-propylprolinu

Mezi důležité podmínky chemické reakce patří pH prostředí, v němž reakce probíhá. Pro nalezení optimální hodnoty pH byla určena závislost koncentrace produktu na pH roztoku Na_3BO_3 , ve kterém byl rozpuštěn chloramin-T (čínidlo používané při oxidaci) a OPA (derivatizace) v oblasti pH 7 až 10. Jedna hodnota pH byla sledována pro oxidaci a derivatizaci současně. Výsledky jsou uvedeny v grafu na obr. 4.2.



Obr. 4.2: Závislost výtěžnosti oxidace a derivatizace 4-propylprolinu na pH

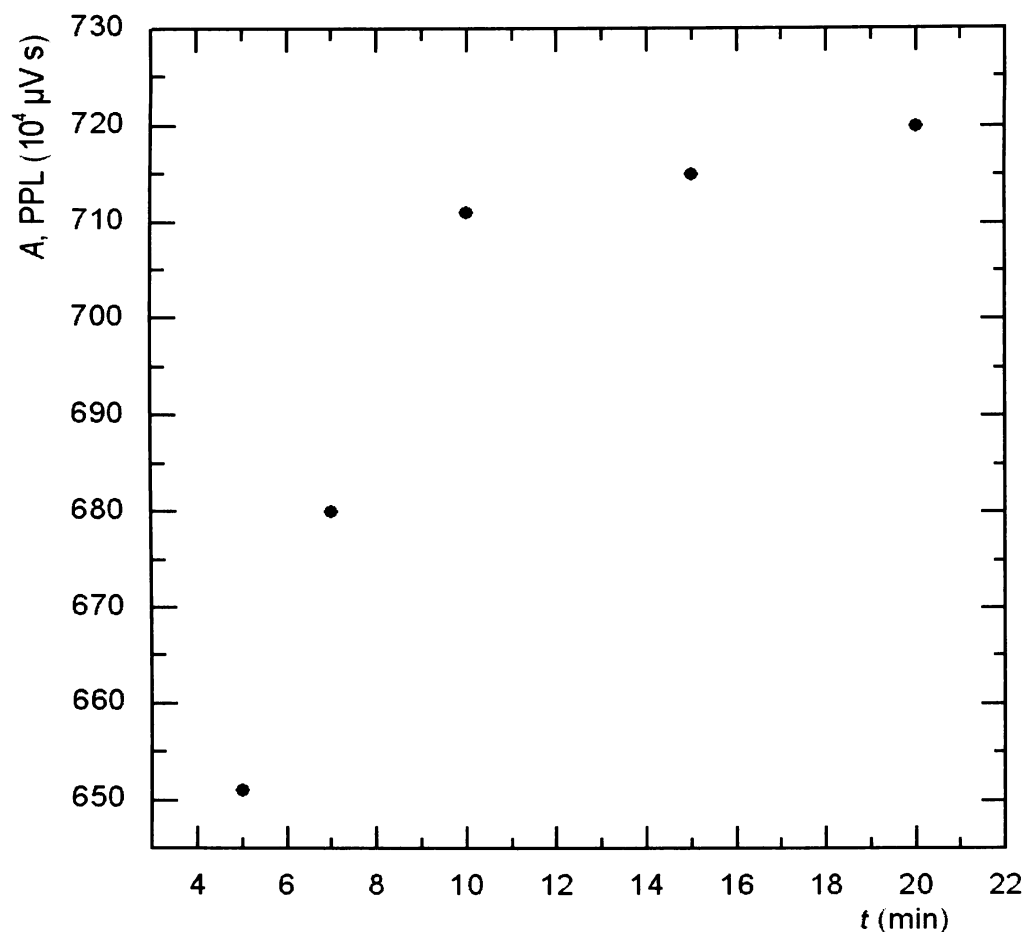
25 μl vzorku 4-propylprolinu o koncentraci $200 \mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH_4 , 70 $^\circ\text{C}$, 10 min, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 3

Z grafu na obr. 4.2 vyplývá, že optimální pH oxidace a derivatizace 4-propylprolinu je 9,5. Tato hodnota byla použita v dalších experimentech.

4.1.2.5 Vliv doby reakce na oxidaci 4-propylprolinu

Za optimální dobu oxidace se považuje čas potřebný ke kvantitativnímu průběhu reakce. Delší doba by zbytečně prodlužovala přípravu vzorku k analýze. Délka reakce vzorku s chloraminem-T po dobu 1 min zůstala zachována. Testována byla až doba

reakce po přidání borohydridu sodného v rozmezí 5 – 20 min. Výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 4.3.



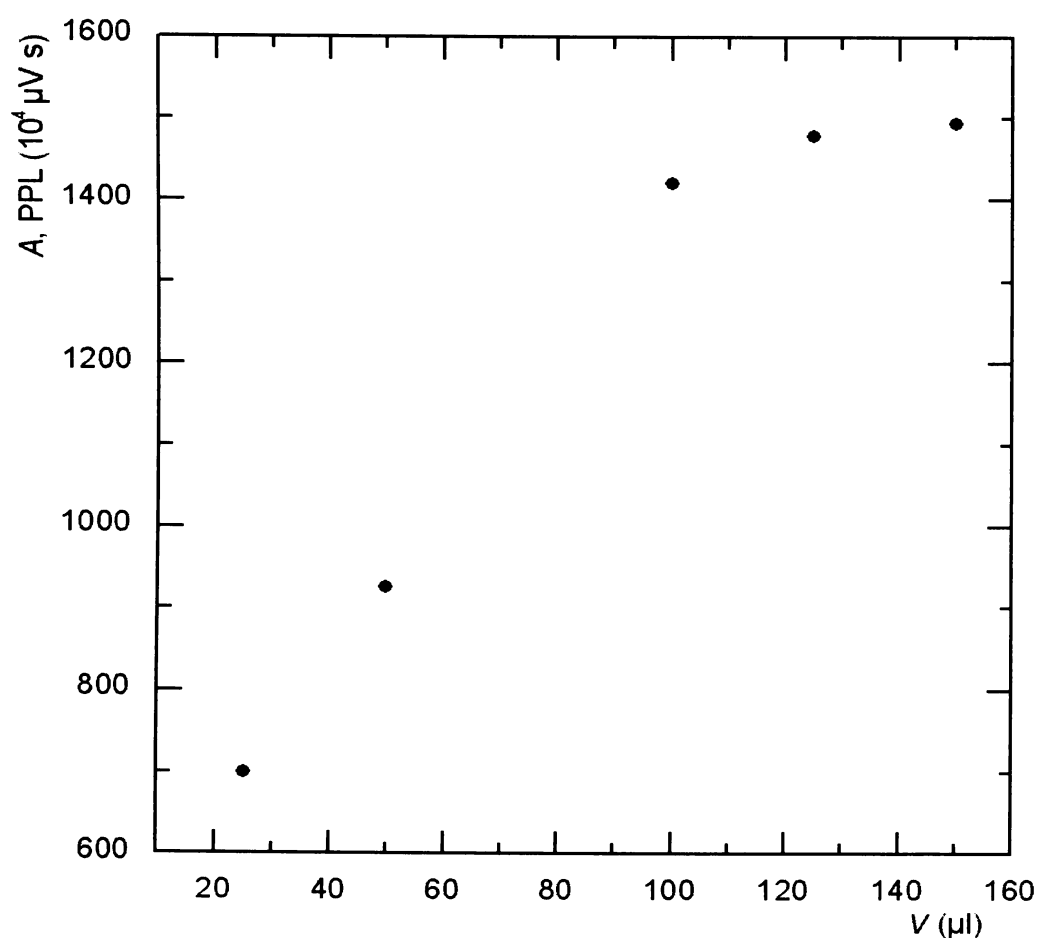
Obr. 4.3: Závislost výtěžnosti oxidace na její době

25 μ l vzorku 4-propylprolinu o koncentraci $200 \mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH_4 , pH 9,5; 70 °C, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 3

S rostoucí dobou oxidace se zvyšuje koncentrace derivatizovaného produktu až do 10. minuty, v rozmezí 10 až 20 min roste koncentrace produktu velmi pomalu, téměř stagnuje. Vzrůst koncentrace derivátu v tomto intervalu je zanedbatelný vzhledem k tomu, že se doba oxidace zdvojnásobila. Proto byla jako nejvhodnější doba pro oxidaci 4-propylprolinu ponechána původní hodnota 10 min.

4.1.2.6 Vliv nadbytku činidel na oxidaci a derivatizaci 4-propylprolinu

Vliv nadbytku činidel pro oxidaci i derivatizaci byl testován současně. Pro zjednodušení byl experiment proveden jako závislost koncentrace derivatizovaného produktu na množství (resp. objemu) přidaného roztoku 4-propylprolinu v rozmezí od 25 μl do 150 μl . K experimentu byl záměrně vybrán roztok 4-propylprolinu o koncentraci 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, což odpovídá dvojnásobku předpokládané výše koncentrace 4-propylprolinu v reálných vzorcích. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4.4.



Obr. 4.4: Závislost koncentrace derivatizovaného produktu na objemu vzorku 4-propylprolinu

vzorek 4-propylprolinu o koncentraci 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH₄, pH 9,5; 70 °C, 10 min, 50 mg ml⁻¹ OPA; HPLC analýza: metoda 4

Jak je patrné z grafu na obr. 4.4, do objemu 100 μl vzorku je nadbytek všech činidel dostatečný. Při zvýšení objemu na 125 μl se již koncentrace výsledného produktu reakce významně nezvyšuje, což je zřejmě způsobeno nedostatečným množstvím některého z činidel. Proto bylo pro další oxidaci a derivatizaci používáno 100 μl vzorku.

4.1.3 Stabilita oxidovaného 4-propylprolinu a jeho derivátu s OPA

Stabilita oxidovaného 4-propylprolinu byla sledována při laboratorní teplotě po dobu 3,5 h. Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.4.

Tab 4.4.: Stabilita oxidovaného 4-propylprolinu

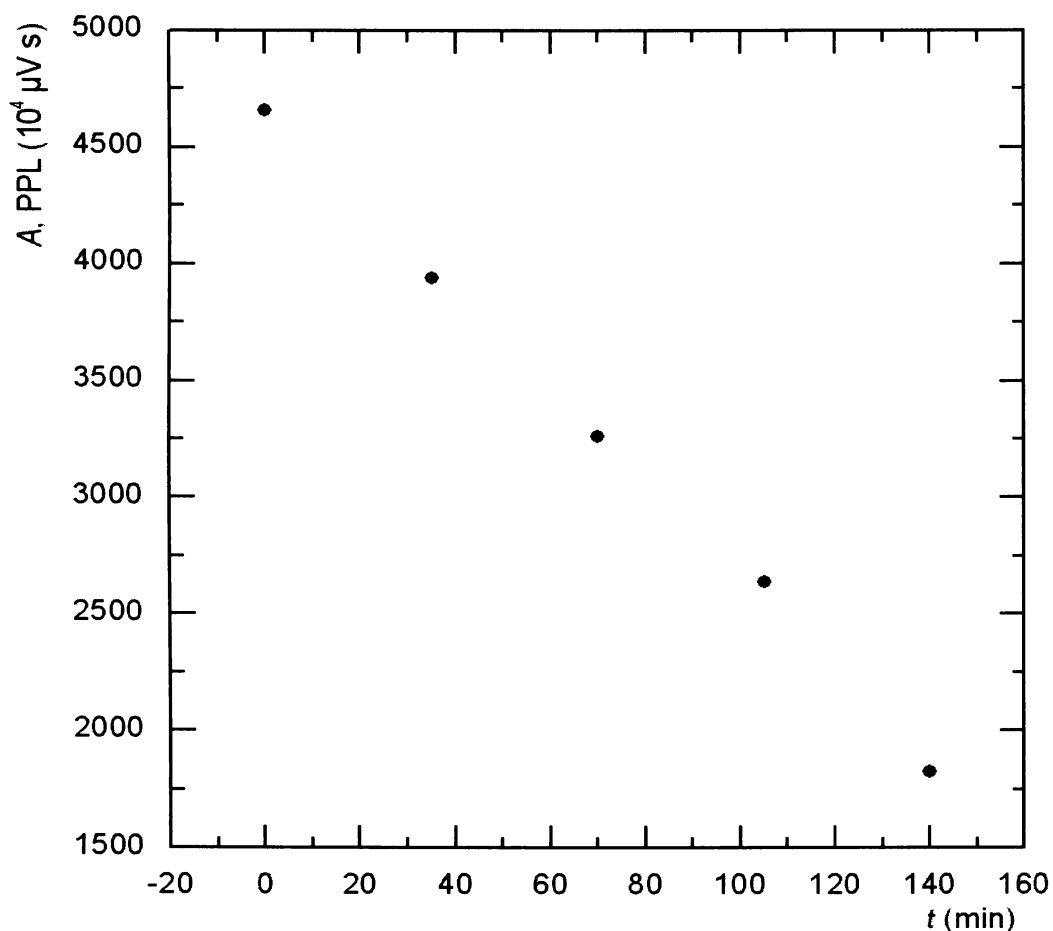
100 μl vzorku 4-propylprolinu o koncentraci 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH_4 , pH 10, 70 $^\circ\text{C}$, 10 min, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 4

t (min)*	A , PPL ($10^4 \mu\text{V s}$)
0	1439
30	1495
90	1462
150	1421
210	1450
průměr	1453
SD	27,7
RSD	1,91

* čas mezi oxidací a derivatizací

Z výsledků je patrné, že oxidovaný 4-propylprolin je při laboratorní teplotě po dobu 3,5 h stálý. Svědčí o tom hodnota RSD 1,91 %. Proto není nezbytné 4-propylprolin derivatizovat ihned po oxidaci.

Stabilita derivátu oxidovaného 4-propylprolinu s OPA byla sledována při laboratorní teplotě po dobu 140 min. Výsledkem je závislost koncentrace derivátu na čase mezi derivatizací a nástřikem na kolonu uvedená na obr. 4.5.



Obr. 4.5: Stabilita derivatizovaného 4-propylprolinu

100 μl vzorku 4-propylprolinu o koncentraci $70 \mu\text{g ml}^{-1}$, oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH_4 , pH 9,5; 70 $^\circ\text{C}$, 10 min, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 5

Ze závislosti vyplývá, že derivát 4-propylprolinu s OPA není stabilní. Je tedy nezbytné vzorek po derivatizaci ihned dávkovat na kolonu.

4.1.4 Metoda stanovení 4-propylprolinu – shrnutí

Ze získaných závislostí byly určeny parametry konečné metody stanovení 4-propylprolinu. 100 μl 10 mM roztoku chloraminu-T v 400 mM Na_3BO_3 (pH 9,5) a DMSO 4:1 (v/v) bylo předehřáto v mikrozkuhavce ve vodní lázni o teplotě 70 $^\circ\text{C}$ po dobu 1 min. Do mikrozkuhavky bylo přidáno 100 μl standardu 4-propylprolinu

o příslušné koncentraci nebo reálného vzorku. Směs byla promíchána a zahřívána 1 min. Ke směsi bylo přidáno 100 μl 300 mM roztoku NaBH_4 v 600 mM LiOH . Směs byla promíchána, zahřívána při 70 $^\circ\text{C}$ 10 min a centrifugována 5 min při 13 400 rpm. Ke 45 μl obsahu mikrozkušavky bylo přidáno 10 μl derivatizačního činidla (směs 50 mg OPA rozpuštěného v 50 μl acetonitrilu a 50 μl 200 mM Na_3BO_3 , pH 9,5 a 4 μl mertkaptoethanolu). Roztok byl promíchán a ihned dávkován na kolonu.

25 μl derivatizovaného vzorku bylo naneseno na analytickou kolonu Luna C 18 (250 \times 4,6 mm I.D., 5 μm , 100 Å) a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: 2,2 mM dihydrogenfosforečnan draselný upravený 1 M hydroxidem draselným na pH 6,9; fáze B: acetonitril). Eluční gradient s lineárním průběhem je uveden v tab. 4.5. Před další analýzou byla kolona 6 min ekvilibrována při 30 % B. Průtok mobilní fáze během celé analýzy byl 1,25 ml ml^{-1} . Vzorky byly detekovány fluorescencí (excitace 336 nm, emise 425 nm), gain 100.

Tab. 4.5: Eluční gradient HPLC separace 4-propylprolinu

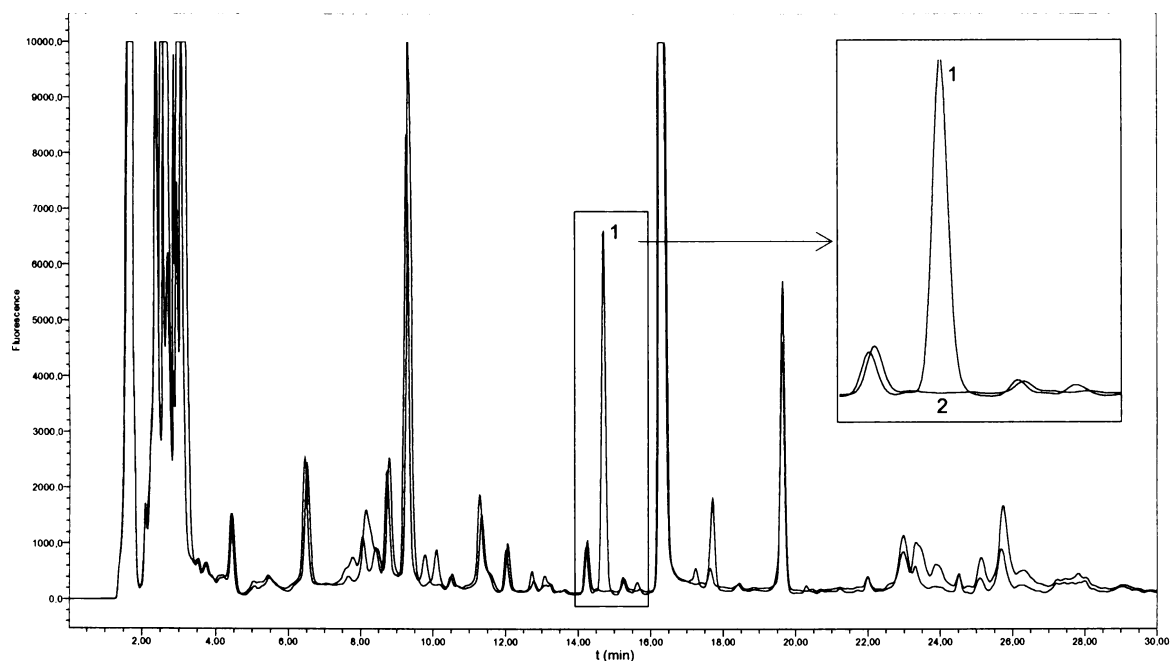
t (min)	% A	% B
0	70	30
1	70	30
25	0	100
27	30	70
29	70	30

4.1.5 Validace metody

Metoda stanovení 4-propylprolinu byla částečně validována podle obecných pravidel popsaných v publikaci [55]. Pozornost byla věnována selektivitě metody, byly provedeny testy správnosti a přesnosti metody včetně ověření hodnoty LOQ a byly posouzeny některé parametry z hlediska robustnosti.

4.1.5.1 Selektivita metody

O dobré selektivě metody svědčí obr. 4.6, z něhož vyplývá, že matrice s píkem derivátu 4-propylprolinu neinterferuje. Pro ilustraci byl vybrán překryv chromatogramů 1 (vzorek B₂1 s přidavkem 4-propylprolinu o konečné koncentraci 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$) a 2 (vzorek B₂1 neobsahující 4-propylprolin).



Obr. 4.6: Srovnání analýzy 4-propylprolinu přidaného do matrice se slepým vzorkem

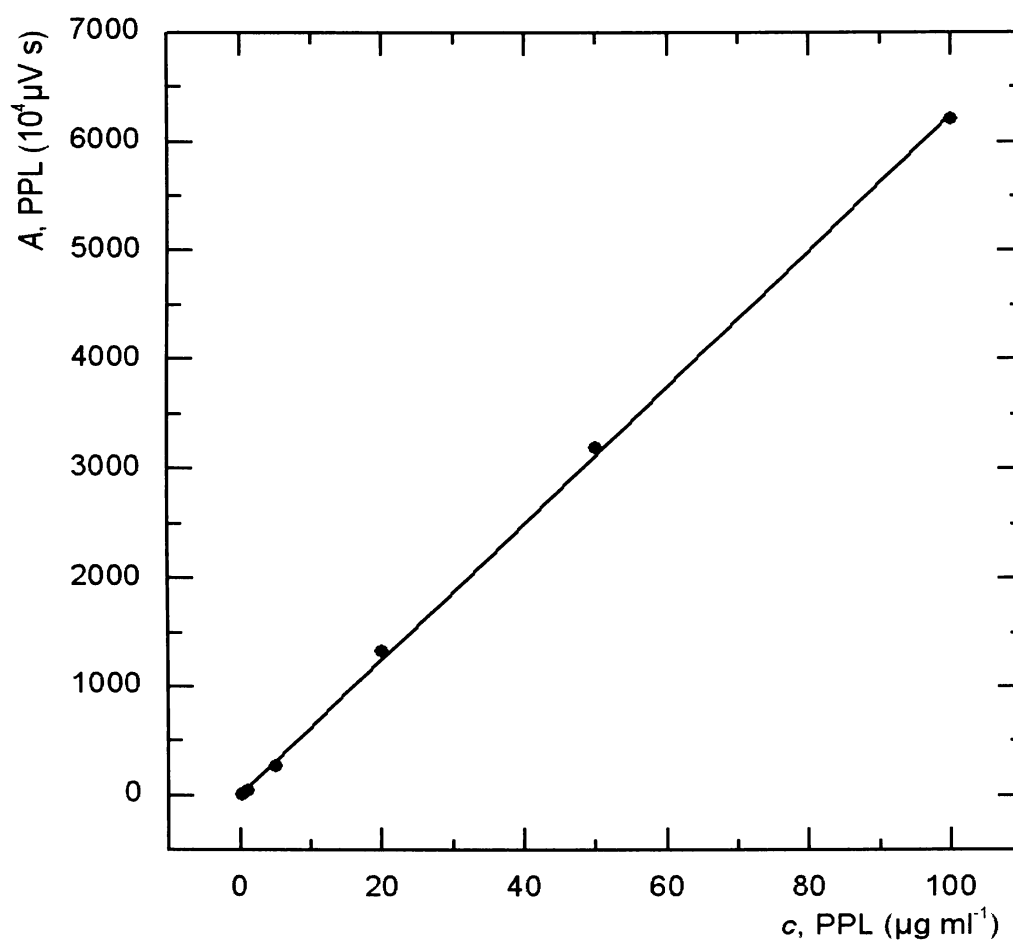
1 – 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ propylprolin v B₂1, pík 4-propylprolinu (14,7 min)

2 – B₂1 (slepý vzorek)

oxidace a derivatizace: 10mM chloramin-T, 300 mM NaBH₄, pH 9,5; 70 °C, 100 μl vzorku, 10 min,
50 mg ml⁻¹ OPA; HPLC analýza: metoda 5

4.1.5.2 Kalibrační přímka, LOD, LOQ

Pro vytvoření kalibrační přímky byly použity roztoky 4-propylprolinu v matrici B₂1 o koncentraci 0,25; 0,5; 1; 5; 20; 50 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Kalibrační přímka je na obr. 4.7, parametry vypočítané z kalibrační křivky jsou uvedeny v tab. 4.6.



Obr. 4.7: Kalibrační přímka 4-propylprolinu

Tab. 4.6: Parametry kalibrační přímky

parametr	hodnota parametru
rovnice	$A = 6,25 \cdot 10^5 c + 3,66 \cdot 10^4$
korelační koeficient (r)	0,9998
determinační koeficient (r^2)	0,9996
$s_{y/x}$	$5,46 \cdot 10^5 \mu\text{V s}$
LOD	$2,62 \mu\text{g ml}^{-1}$
LOQ	$8,65 \mu\text{g ml}^{-1}$

Vliv matrice na výtěžnost oxidační a derivatizační reakce byl eliminován použitím kalibračních roztoků 4-propylprolinu v matrici B₂₁, která přirozeně produkovaný 4-propylprolin neobsahuje.

4.1.5.3 Správnost a přesnost metody

Správnost a přesnost byla testována na třech koncentračních úrovních (8, 30, 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$) roztoků 4-propylprolinu v matrici B₂₁. Hodnota nejnižší koncentrace byla zvolena na úrovni hodnoty LOQ (verifikace hodnoty LOQ). Koncentrace dalších dvou roztoků se pohybovaly v rozmezí hodnot kalibrační přímky. Každá koncentrační hladina byla testována pětkrát. Výsledky testu jsou uvedeny v tab. 4.7.

Tab. 4.7: Validační test metody stanovení 4-propylprolinu

Nominální c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Správnost	Přesnost	
		kvantita*	kvalita**
	x (%)	RSD (%)	
8	96,5	4,54	0,16
30	103,8	5,05	0,22
70	101,3	1,45	0,26

* vypočteno z naměřených koncentrací, ** vypočteno z t_r

Správnost metody byla procentuelně vyjádřena srovnáním naměřené koncentrace s koncentrací nominální. Kritérium odchylky u koncentrace 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do 20 % a u koncentrací 30 a 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do 15 % bylo ve všech případech splněno. Splněním uvedených podmínek pro nejnižší hodnotu koncentrace (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) byla potvrzena hodnota LOQ.

Přesnost metody byla testována z hlediska kvantitativního (RSD naměřených koncentrací 4-propylprolinu) a kvalitativního (RSD retenčních časů 4-propylprolinu). V prvním případě se RSD koncentrací 8 a 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pohybuje pod 5 %, pro koncentraci 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ překračuje RSD hodnotu 5 % jen těsně. RSD retenčních časů nepřekračuje hodnotu 1 %.

4.1.5.4 Robustnost metody

Součástí validace metody je testování její robustnosti. Malou změnou některých kroků postupu může dojít k posunutí retenčního času píku 4-propylprolinu, který by tak mohl být zaměněn s píkem jiné látky. Malou změnou postupu oxidace a derivatizace 4-propylprolinu může dojít k nedostatečnému proběhnutí reakce, což by vedlo ke kvantitativní chybě stanovení. Aby se těmto situacím předešlo, byly vytipovány kroky v postupu metody, které by mohly výsledek analýzy významným způsobem ovlivnit.

V případě chromatografických podmínek ovlivňující především retenční čas analytu je třeba věnovat pozornost přípravě mobilní fáze.

pH mobilní fáze může mít významný vliv na separaci. Z hlediska robustnosti metody byla sledována změna pH KH_2PO_4 v oblasti 6,2 – 7,9 a její důsledek v analýze. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4.8.

Tab. 4.8: Vliv pH mobilní fáze na analýzu 4-propylprolinu

pH*	t_r (min)	c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)**
6,2	13,82	73,76
6,4	13,82	73,15
6,9	13,87	71,08
7,4	13,82	72,36
7,9	13,84	72,48
průměr	13,83	72,57
SD	0,02	1,00
RSD (%)	0,14	1,38

* pH pufru (KH_2PO_4)

** změřená koncentrace roztoku 4-propylprolinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci $70 \mu\text{g ml}^{-1}$

Z údajů v tab. 4.8 je zřejmé, že vliv pH na separaci i kvantifikaci 4-propylprolinu je v oblasti 6,2 – 7,9 zanedbatelný.

Vliv koncentrace KH_2PO_4 (iontová síla pufru) na separaci 4-propylprolinu byl jako další parametr testován v rozmezí 2 až 5 mmol dm^{-3} . Výsledky jsou uvedeny v tab. 4.9.

Tab. 4.9: Vliv iontové síly pufru na analýzu 4-propylprolinu

$c, \text{KH}_2\text{PO}_4$ (mmol dm^{-3})	t_r (min)	c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)*
2,0	13,82	71,25
2,2	13,86	72,36
2,5	13,87	71,45
5,0	13,91	71,48
průměr	13,87	71,63
SD	0,04	0,49
RSD (%)	0,27	0,69

* změřená koncentrace roztoku 4-propylprolinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci $70 \mu\text{g ml}^{-1}$

Podle výsledků v tab. 4.9 není vliv iontové síly v rozmezí 2,0 až $5,0 \text{ mmol l}^{-1}$ významný.

Dalším parametrem, který je třeba otestovat v rámci robustnosti, je objem přidaného acetonitrilu k roztoku KH_2PO_4 (pufru). Ke 100 ml pufru je přidáváno 10 ml acetonitrilu. Při tomto kroku může dojít k nepřesnému odměření objemu acetonitrilu. Proto byl standardní postup srovnán s případem, kdy bylo ke 100 ml pufru přidáno 9 resp. 11 ml acetonitrilu. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tab. 4.10.

Tab. 4.10: Vliv přídavku acetonitrilu k pufru na analýzu 4-propylprolinu

V (ml)*	t_r (min)	c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)**
9	15,04	68,59
10	14,70	71,25
11	14,47	73,91
průměr	14,74	71,25
SD	0,03	2,66
RSD (%)	1,95	3,73

** změřená koncentrace roztoku 4-propylprolinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci $70 \mu\text{g ml}^{-1}$

Z výsledků vyplývá, že metoda je robustní i v případě přídavku acetonitrilu k pufru. Odchylka retenčního času ani změřených koncentrací při sníženém i zvýšeném přídavku

acetonitrilu nepřesahuje 5 %, přesto měla změna tohoto parametru vedle pH a iontové síly pufru na analýzu největší vliv.

V případě oxidace a derivatizace 4-propylprolinu je třeba otestovat stabilitu derivátu oxidovaného 4-propylprolinu s OPA, tedy vliv prodlevy mezi derivatizací a nástřikem na kolonu, ke které může při provádění analýzy dojít. Výsledky jsou shrnuty v tab. 4.11.

Tab. 4.11: Vliv doby mezi derivatizací a dávkováním na kolonu

t (s) [*]	c ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ^{**}	Odchylka (%) ^{***}
0	71,52	2,17
10	68,89	1,89
20	66,90	4,43
60	63,79	8,87
průměr	67,78	-
SD	3,26	-
RSD	4,81	-

* čas mezi derivatizací a dávkováním na kolonu

** naměřená koncentrace roztoku 4-propylprolinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$

*** odchylka naměřené koncentrace od nominální koncentrace

Z výsledků vyplývá, že je třeba zachovat mezi derivatizací a dávkováním na kolonu co nejkratší dobu, maximálně však 20 sekund. Po této době je již odchylka mezi správnou a naměřenou koncentrací vyšší než 5 %.

4.1.6 Aplikace metody (reálné vzorky)

Vyvinutá metoda byla aplikována na analýzu 4-propylprolinu v reálných vzorcích kultivačního média *Streptomyces lincolnensis*.

Bylo testováno šest reálných vzorků, ve čtyřech byl potvrzen a kvantifikován 4-propylprolin (viz tab. 4.12).

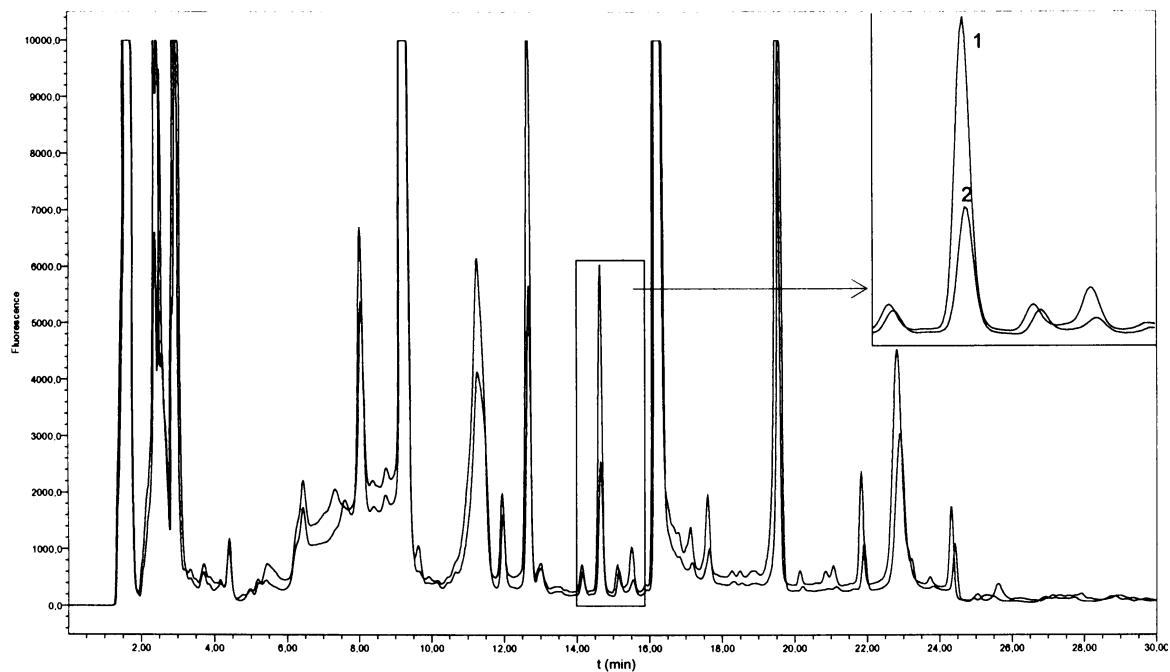
Tab. 4.12: Výsledky analýzy reálných vzorků

Vzorek	<i>c</i> , PPL ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
N1	27,13
N1+PPL 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	58,54
N2	3,73*
N12	29,21
D1	3,00*
D1+PPL 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$	9,81
WT	0**
X12	0**

* orientační hodnota (pod LOQ), ** pod hodnotou LOD

Pro ověření identity vzniklého derivátu 4-propylprolinu byl vždy s testovaným reálným vzorkem srovnáván reálný vzorek s definovaným přídatkem 4-propylprolinu. Překryv takto získaných chromatogramů je na obr. 4.8 (pro vzorek N1) a na obr. 4.9 (pro vzorek D1). Detail překrytých píků s retenčním časem 14,7 min znázorňuje pík (1) odpovídající součtu koncentrace 4-propylprolinu ve vzorku a koncentrace 4-propylprolinu do vzorku přidaného a pík (2) odpovídající skutečné koncentraci 4-propylprolinu v reálném vzorku.

Na obr. 4.8 je překryv chromatogramu vzorku N1 a vzorku N1 s přidavkem 4-propylprolinu v B₂1 o konečné koncentraci 30 µg ml⁻¹. Překryv těchto chromatogramů dokazuje přítomnost 4-propylprolinu ve vzorku N1.



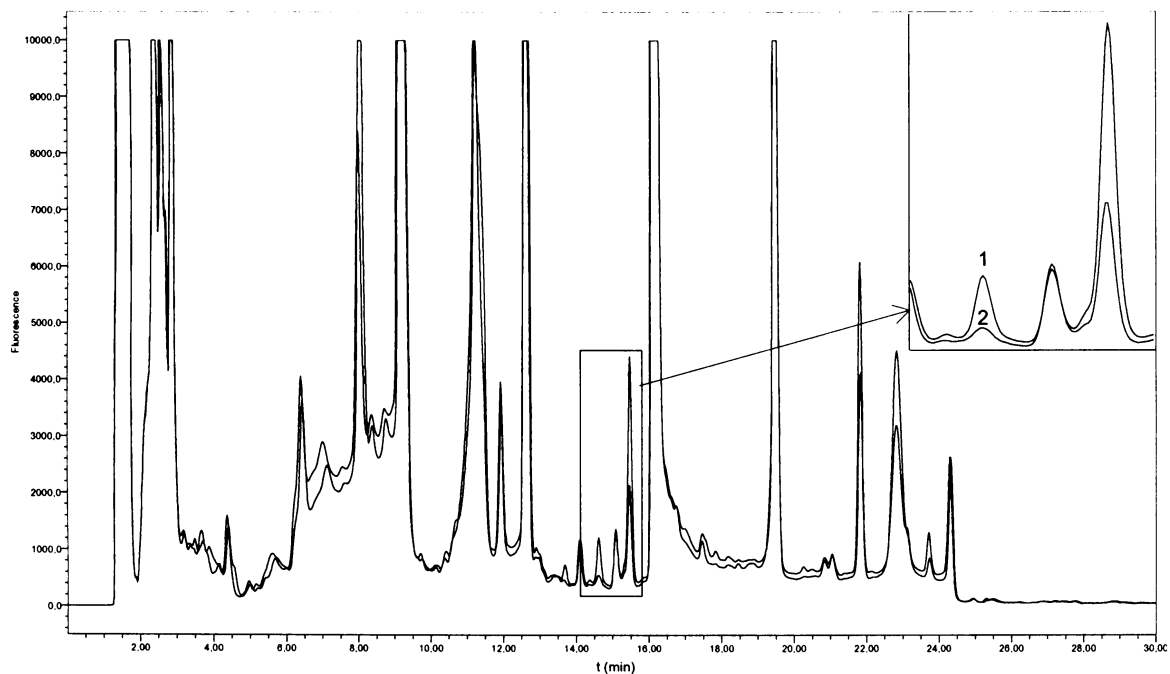
Obr. 4.8: Překryv chromatogramu vzorku N1 a vzorku N1 obsahující 4-propylprolin o koncentraci 30 µg ml⁻¹

1 – vzorek N1 + 4-propylprolin 30 µg ml⁻¹, pík 4-propylprolinu

2 – vzorek N1, pík 4-propylprolinu

oxidace a derivatizace: 10mM chloramin T, 300 mM NaBH₄, pH 9,5; 70 °C, 100 µl vzorku, 10 min, 50 mg ml⁻¹ OPA; HPLC analýza: metoda 5

Na obr. 4.9 je překryv chromatogramů vzorku D1 a vzorku D1, s přidavkem 4-propylprolinu v B₂1 o konečné koncentraci 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Překryv chromatogramů dokazuje přítomnost 4-propylprolinu ve vzorku D1, jeho koncentrace je pod LOQ.



Obr. 4.9: Překryv chromatogramu vzorku D1 a vzorku D1 obsahující 4-propylprolin o koncentraci 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$

1 – vzorek D1 + 4-propylprolin 7 $\mu\text{g ml}^{-1}$, pík 4-propylprolinu

2 – vzorek D1, pík 4-propylprolinu

oxidace a derivatizace: 10mM chloramin T, 300 mM NaBH₄, pH 9,5; 70 °C, 100 μl vzorku, 10 min, 50 mg ml^{-1} OPA; HPLC analýza: metoda 5

4.2 Stanovení N-demethyllinkomycinu

V kapitole 2.2.2 je uveden výčet metod stanovení, které je možné použít jako předlohu k vývoji analytické metody stanovení N-demethyllinkomycinu a v kapitole 2.2.3 jsou na základě diskuze z těchto metod vybrány dvě, které byly využity.

Metoda Olšovské [4] pro stanovení linkomycinu nebyla aplikovatelná na stanovení N-demethyllinkomycinu. Hlavními problémy byla interference stanovované látky s maticí a slabá absorpce v UV oblasti, na které je metoda založena.

Analytická metoda stanovení N-demethyllinkomycinu byla tedy vyvíjena na základě metody [6] pro stanovení methylthiolinkosamidu v kultivačním médiu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci NBD-Cl.

Modifikací této metody byla vyvinuta nová metoda vhodná pro stanovení N-demethyllinkomycinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis*.

4.2.1 Chromatografické podmínky a podmínky detekce

Metoda 1 představuje metodu, která byla použita k separaci methylthiolinkosamidu v publikaci [6]. Ostatní metody byly vytvořeny postupnou úpravou předchozí metody.

Metoda 1. 10 μl derivatizovaného vzorku bylo nanášeno na analytickou kolonu Alltech, Econosphere C 18 ($250 \times 4,6$ mm I.D.) a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: 2,2 mM dihydrogenfosforečnan sodný, pH 6,9; fáze B: methanol). Eluční gradient lineárně rostl z 10 % na 33 % B za 5 min a dále na 50 % B za 15 min. Poté byla kolona 10 min vymývána 100 % B a 8 min ekvilibrována při 10 % B. Průtok mobilní fáze během celé analýzy byl 1 ml ml^{-1} . Vzorky byly detekovány fluorescencí (excitace 240 nm, emise 417 nm).

Metoda 2. Podmínky metody 1 byly modifikovány následujícím způsobem.

10 μl derivatizovaného vzorku bylo nanášeno na analytickou kolonu Luna C 18 ($250 \times 4,6$ mm I.D., 5 μm , 100 Å), Phenomenex a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: 2,2 mM dihydrogenfosforečnan draselný upravený 1 M hydroxidem draselným na pH 6,9 a acetonitril (10:1); fáze B: acetonitril). Eluční gradient lineárně rostl z 15 % na 95 % B za 15 min. Po 2 min vymytí kolony 95 % B byla kolona převedena do 15 % B za 1 min a ekvilibrována 6 min. Gain fluorescenčního detektoru byl nastaven na hodnotu 10.

Metoda 3. Nedostatečná separace píku N-demethylinkomycinu byla důvodem úpravy elučního gradientu.

Eluční gradient lineárně rostl z 10 % na 33 % B za 5 min a dále na 50 % B za 15 min. Kolona byla dále převedena do 98 % B za 1 min a poté 6 min ekvilibrována při 10 % B.

Metoda 3 je konečnou chromatografickou metodou pro stanovení N-demethylinkomycinu.

4.2.2 Derivatizace N-demethylinkomycinu

Methylthiolinkosamid je v publikaci [6] derivatizován následujícím způsobem.

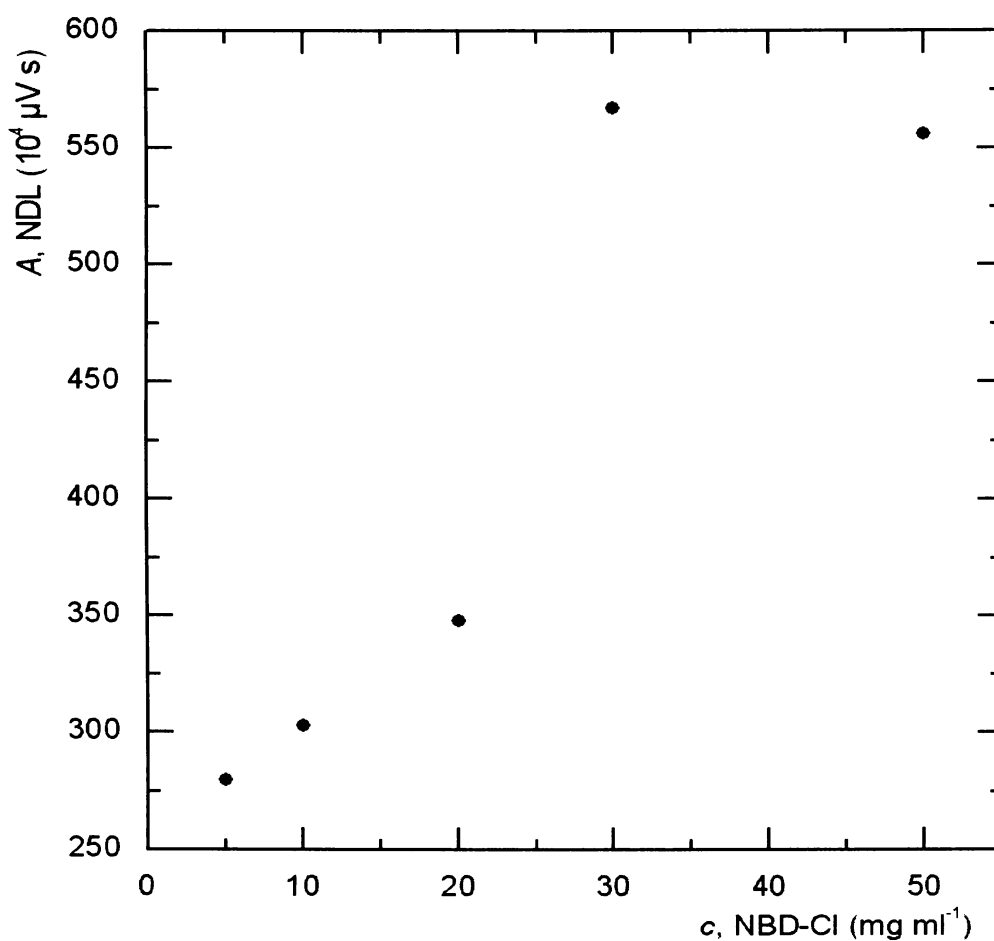
Ke 400 μl roztoku standardu N-demethylinkomycinu v mikrozkuhavce bylo přidáno 100 μl 1 M roztoku NaHCO_3 a 500 μl NBD-Cl v methanolu o koncentraci 30 mg ml^{-1} . Mikrozkuhavka byla promíchána a 4 h zahřívána ve vodní lázni o teplotě 60 $^\circ\text{C}$. Poté byla směs ochlazená ledem, filtrována a dávkována na kolonu.

Derivatizace N-demethylinkomycinu byla provedena s následujícími úpravami. K reakci byly použity poloviční objemy reagentů (200 μl vzorku, 50 μl 1 M NaHCO_3 , 250 μl NBD-Cl o koncentraci 30 mg ml^{-1}). Po derivatizaci byla reakční směs 30 min chlazená při teplotě -24°C a centrifugována (13400 rpm, 5 min). Supernatant byl dávkován na kolonu.

Pro dosažení co nejnižších hodnot LOD a LOQ byly optimalizovány tyto parametry derivatizace N-demethylinkomycinu: nadbytek NBD-Cl, teplota reakce a doba derivatizace.

4.2.2.1 Vliv nadbytku NBD-Cl na derivatizaci N-demethylinkomycinu

Testování nadbytku NBD-Cl bylo provedeno při zachování objemu přidaného roztoku derivatizačního činidla změnou jeho koncentrace. N-demethylinkomycin byl derivatizován roztokem NBD-Cl o koncentracích 5, 10, 20, 30 a 50 mg ml^{-1} . Analýza byla provedena metodou 2, výsledky jsou uvedeny v grafu na obr. 4.10



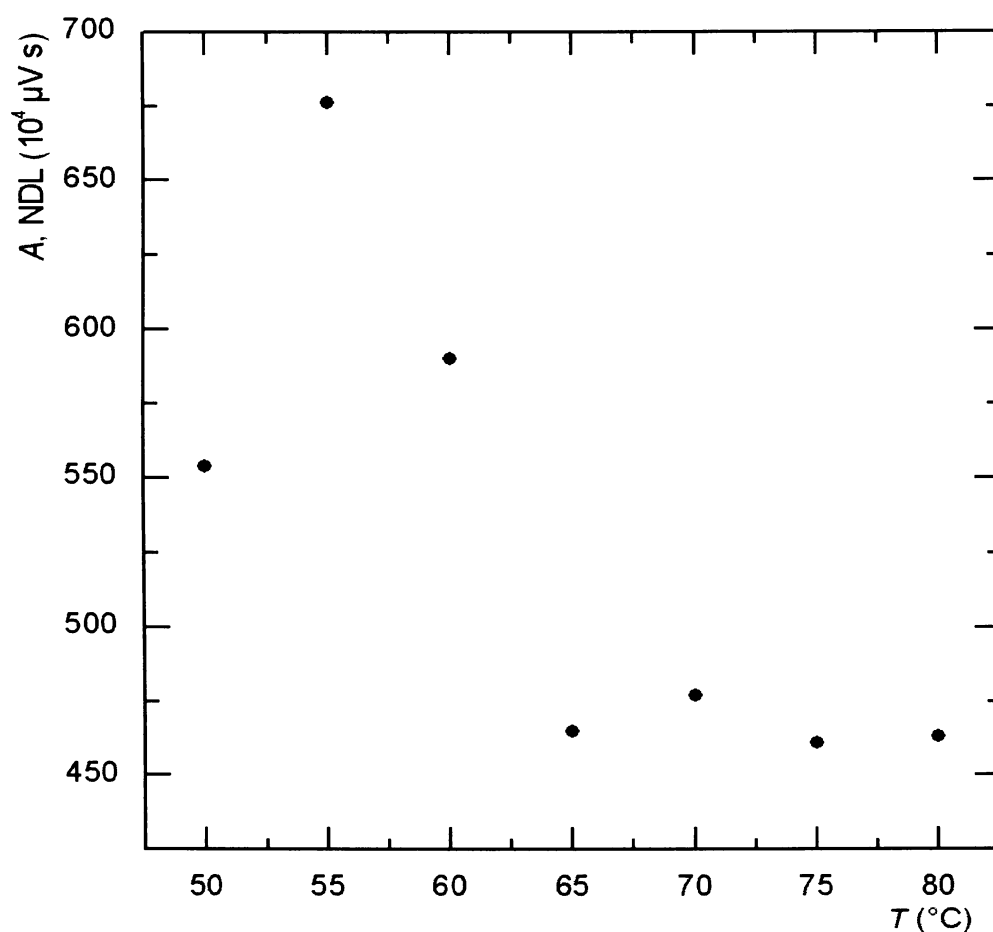
Obr. 4.10: Závislost plochy píku N-demethylinkomycinu na koncentraci NBD-Cl

N-demethylinkomycin o koncentraci 25 μg ml⁻¹; derivatizace: 60 °C, 4 h; HPLC analýza: metoda 2

Z grafu na obr. 4.10 je patrné, že výtěžnost derivatizace je nejvyšší při použití NBD-Cl o koncentraci 30 mg ml⁻¹. Koncentrace derivatizačního činidla tedy nebyla změněna.

4.2.2.2 Vliv teploty reakce na derivatizaci N-demethylinkomycinu

Důležitou roli při derivatizační reakci hraje teplota. Optimální teplota pro derivatizaci N-demethylinkomycinu byla testována v rozmezí od 50 °C do 80 °C po 5 °C. Analýza byla provedena metodou 2, výsledky jsou uvedeny v grafu na obr. 4.11.



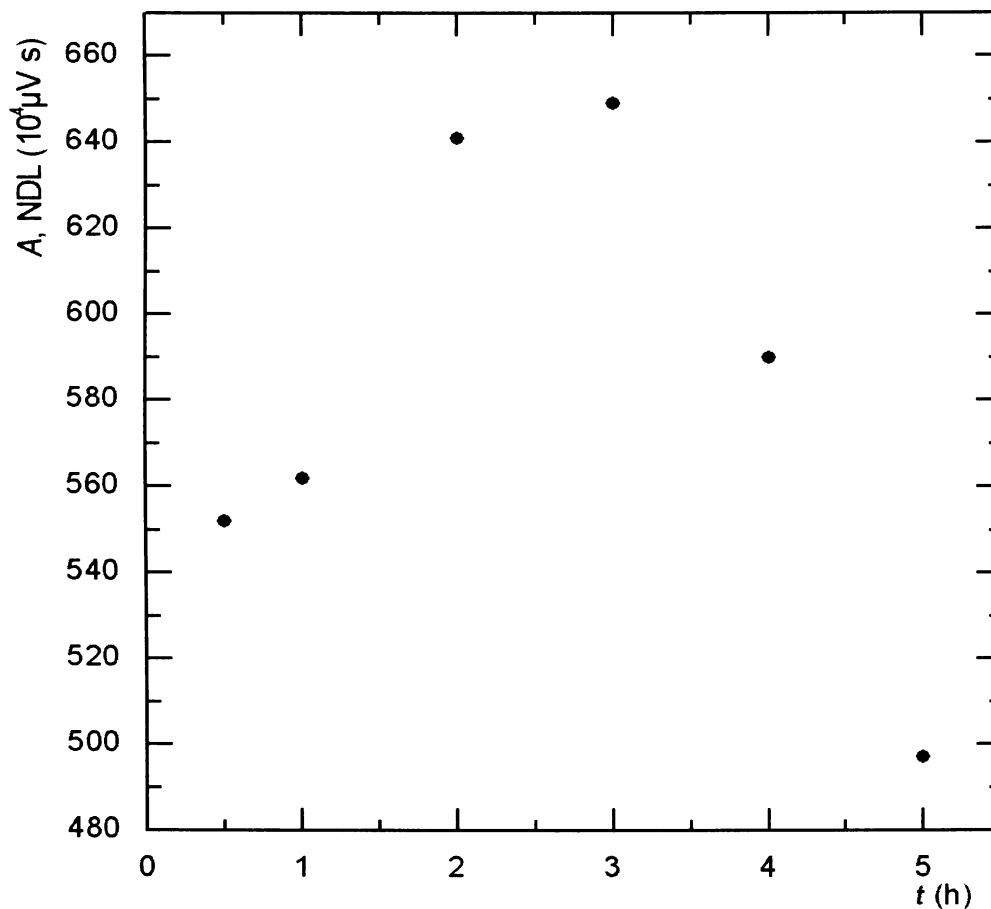
Obr. 4.11: Vliv teploty reakce na výtěžnost derivatizace

N-demethyllinkomycin o koncentraci $25 \mu\text{g ml}^{-1}$, derivatizace: 30 mg ml^{-1} NBD-Cl, 4 h; HPLC analýza: metoda 2

Z výsledků vyplývá, že optimální teplotou pro derivatizaci N-demethyllinkomycinu je $55 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.2.2.3 Vliv doby reakce na derivatizaci N-demethyllinkomycinu

Maximální výtěžek derivatizace N-demethyllinkomycinu je podmíněn dostatečnou dobou reakce. Ta byla testována v rozpětí od 0,5 h do 5 h. Analýza byla provedena metodou 2, výsledky jsou zobrazeny v grafu na obr. 4.12.



Obr. 4.12: Vliv doby reakce na výtěžnost derivatizace, metoda 2

25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ N-demethylinkomycin, derivatizace: 30 mg ml^{-1} NBD-Cl, 60 °C; HPLC analýza: metoda 2

Největší výtěžnosti derivatizace N-demethylinkomycinu bylo dosaženo při době reakce 3 h. Jako optimální doba derivatizace však byla zvolena hodnota 2 h, která poskytuje jen o málo menší výtěžnost oproti 3 h za současného zkrácení doby derivatizace o jednu třetinu.

4.2.3 Stabilita derivatizovaného N-demethylinkomycinu

Možnost automatizace metody, tedy analýza série vzorků s využitím autosampleru, je podmíněna stabilitou derivatizovaného N-demethylinkomycinu. Ta byla testována po

dobu 15 h mezi ukončením derivatizace a nástřikem na kolonu. Analýza byla provedena metodou 3. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tab. 4.13.

Tab. 4.13: Stabilita derivatizovaného N-demethylkomycinu, metoda 3

70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ N-demethylkomycin, derivatizace: 30 mg ml^{-1} NBD-Cl, 55 °C; 2 h; HPLC analýza: metoda 3

t (h) [*]	A, NDL ($10^4 \mu\text{V s}$)
1,0	1966
5,5	1983
11,0	2027
15,5	2097
průměr	2018
SD	58,45
RSD (%)	2,90

^{*}čas mezi derivatizací a analýzou

Z výsledků v tab. 4.13 vyplývá, že je derivát N-demethylkomycinu je stabilní po dobu min. 15,5 h. Nepatrný nárůst plochy je pravděpodobně způsoben odpařováním rozpouštědla z reakční směsi v době mezi derivatizací a dávkováním na kolonu.

4.2.4 Metoda stanovení N-demethylkomycinu – shrnutí

Optimalizací metody popsané v publikaci [6] byla vyvinuta metoda stanovení N-demethylkomycinu v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis* pomocí HPLC s fluorescenční detekcí po derivatizaci NBD-Cl.

K 200 μl vzorku v mikrozkuhavce bylo přidáno 50 μl 1 M roztoku NaHCO_3 a 250 μl NBD-Cl v methanolu o koncentraci 30 mg ml^{-1} . Směs byla promíchána a zahřívána ve vodní lázni o teplotě 55 °C. Po 2 h derivatizaci byla reakční směs 30 min chlazená při teplotě -24 °C a centrifugována (13400 rpm, 5 min). Supernatant byl analyzován.

10 μl derivatizovaného vzorku (supernatantu) bylo nanášeno na analytickou kolonu Luna C 18 (250 \times 4,6 mm I.D., 5 μm , 100 Å), Phenomenex a eluováno dvousložkovou mobilní fází (fáze A: 2,2 mM dihydrogenfosforečnan draselný upravený 1 M

hydroxidem draselným na pH 6,9; fáze B: acetonitril). Eluční gradient s lineárním průběhem je uveden v tab. 4.14. Před další analýzou byla kolona 6 min ekvilibrována při 10 % B. Průtok mobilní fáze během celé analýzy byl 1,00 ml ml⁻¹. Vzorky byly detekovány fluorescencí (excitace 240 nm, emise 417 nm), gain 10.

Tab. 4.14: Eluční gradient HPLC separace N-demethylinomycinu

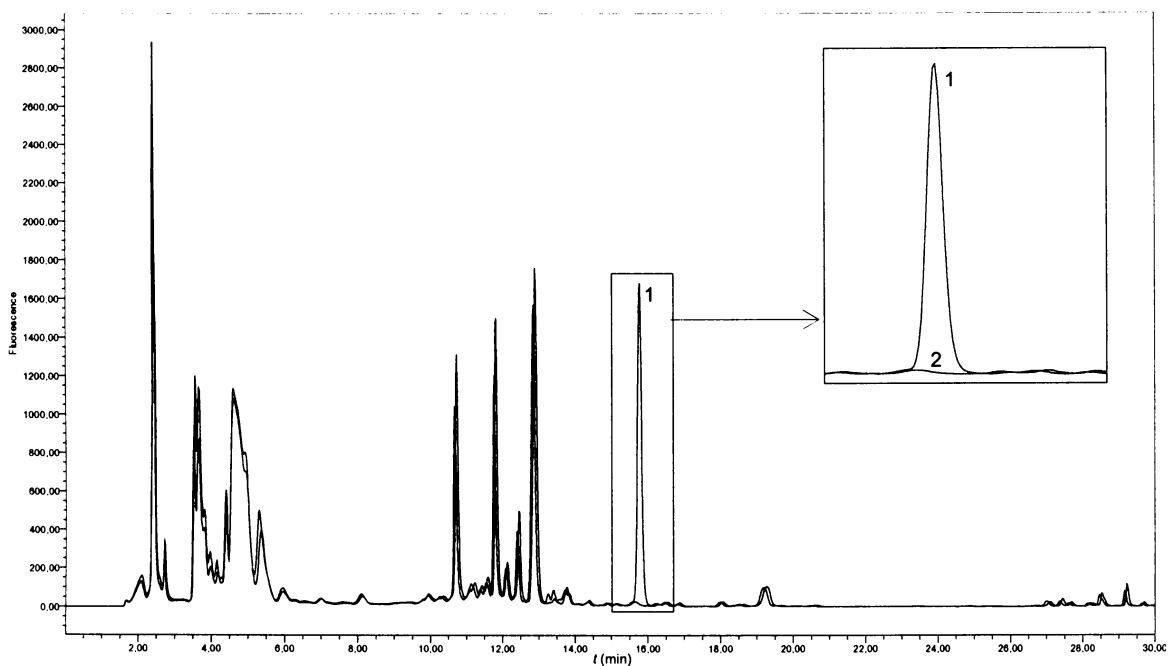
<i>t</i> (min)	% A	% B
0	90	10
5	90	33
20	50	50
21	2	98
24	2	98
25	90	10

4.2.5 Validace metody

Metoda stanovení N-demethylinomycinu byla částečně validována na základě publikace [55]. Pozornost byla věnována selektivitě metody, byly provedeny testy správnosti a přesnosti metody včetně ověření hodnoty LOQ a byly posouzeny některé parametry z hlediska robustnosti.

4.2.5.1 Selektivita metody

O dobré selektivitě metody svědčí obr. 4.13, z něhož vyplývá, že matrice s píkem derivátu N-demethylinomycinu neinterferuje. Pro ilustraci byl vybrán překryv chromatogramů 1 (vzorek B₂1 s přidavkem N-demethylinomycinu o konečné koncentraci 70 µg ml⁻¹) a 2 (vzorek B₂1 neobsahující N-demethylinomycin).



Obr. 4.13: Srovnání analýzy N-demethylkanamycinu přidávaného do matrice se slepým vzorkem

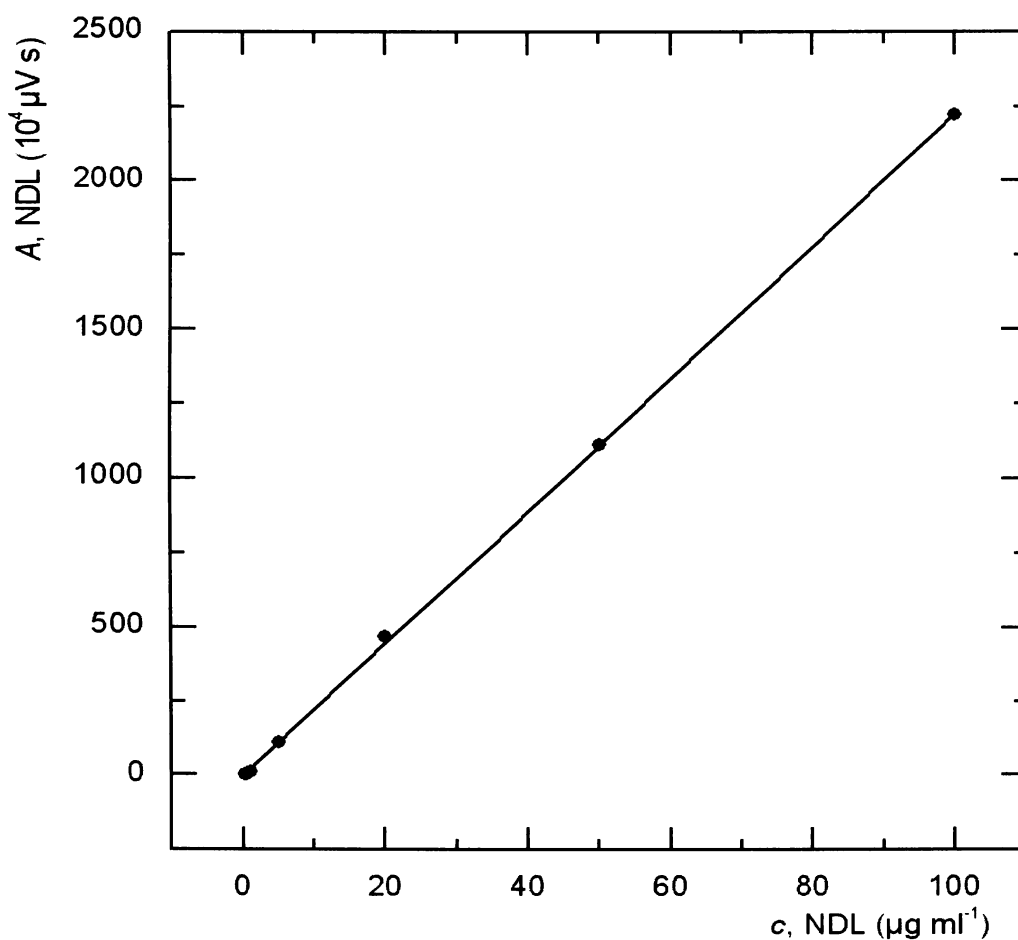
1 – 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ N-demethylkanamycin v B₂1, pík N-demethylkanamycinu (15,6 min)

2 – B₂1 (slepý vzorek)

derivatizace: 30 mg ml^{-1} NBD-Cl, 55 °C; 2 h; HPLC analýza: metoda 3

4.2.5.2 Kalibrační přímka, LOD, LOQ

Pro vytvoření kalibrační přímky byly použity roztoky N-demethylkanamycinu v matrici B₂1 o koncentraci 0,5; 1; 5; 20; 50 a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Kalibrační přímka je na obr. 4.14, parametry vypočítané z kalibrační přímky jsou uvedeny v tab. 4.15.



Obr. 4.14: Kalibrační přímka N-demethylinkomycinu

Tab. 4.15: Parametry kalibrační přímky

parametr	hodnota parametru
rovnice	$A = 2,23 \cdot 10^5 c - 1,66 \cdot 10^4$
korelační koeficient (r)	0,9999
determinační koeficient (r^2)	0,9998
$s_{y/x}$	$1,33 \cdot 10^5 \mu\text{V s}$
LOD	$1,79 \mu\text{g ml}^{-1}$
LOQ	$5,90 \mu\text{g ml}^{-1}$

Vliv matrice na výtěžnost derivatizační reakce byl eliminován použitím kalibračních roztoků N-demethylinkomycinu v matrici B₂1, která přirozeně produkovaný N-demethylinkomycin neobsahuje.

4.2.5.3 Správnost a přesnost metody

Správnost a přesnost byla testována na třech koncentračních úrovních (5, 30, 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$) roztoků N-demethyllinkomycinu v matrici B₂1. Hodnota nejnižší koncentrace byla zvolena na úrovni hodnoty LOQ (verifikace hodnoty LOQ). Koncentrace dalších dvou roztoků se pohybovaly v rozmezí hodnot kalibrační přímky. Každá koncentrační hladina byla testována pětkrát. Výsledky testu jsou uvedeny v tab. 4.16.

Tab. 4.16: Validační test metody stanovení N-demethyllinkomycinu

Nominální c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Správnost	Přesnost	
		Kvantita*	Kvalita**
	x (%)	RSD (%)	
5	96,5	2,97	0,05
30	103,8	2,06	0,07
70	101,3	4,29	0,07

* vypočteno z naměřených koncentrací, ** vypočteno z t_r

Správnost metody byla procentuelně vyjádřena srovnáním naměřené koncentrace s koncentrací nominální. Kritérium odchylky u koncentrace 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do 20 % a u koncentrací 30 a 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do 15 % bylo ve všech případech splněno. Splněním uvedených podmínek pro nejnižší hodnotu koncentrace (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) byla verifikována hodnota LOQ.

Přesnost metody byla testována z hlediska kvantitativního (RSD naměřených koncentrací 4-propylprolinu) a kvalitativního (RSD retenčních časů 4-propylprolinu). Hodnoty RSD naměřených koncentrací nepřekračují hodnotu 5 %, v případě retenčních časů nepřekračují hodnotu 1 %.

4.2.5.4 Robustnost metody

U postupu metody stanovení N-demethylinkomycinu byly vytipovány nejkritičtější kroky, které by i při nevýznamné změně mohly ovlivnit analýzu.

V první řadě byl sledován vliv pH na analýzu N-demethylinkomycinu v oblasti 6,9 – 7,9. Z výsledků uvedených v tab. 4.17 vyplývá, že ve sledované oblasti pH mobilní fáze (resp. pH, KH_2PO_4) významným způsobem neovlivňuje retenční čas N-demethylinkomycinu.

Tab. 4.17: Vliv pH mobilní fáze na analýzu N-demethylinkomycinu

pH*	t_r (min)	c , NDL ($\mu\text{g ml}^{-1}$)**
6,2	15,60	73,92
6,4	15,57	72,24
6,9	15,58	72,73
7,4	15,57	71,98
7,9	15,56	72,21
průměr	15,58	72,62
SD	0,02	0,78
RSD (%)	0,97	1,07

*pH pufru (roztoku KH_2PO_4)

**změřená koncentrace roztoku N-demethylinkomycinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci $70 \mu\text{g ml}^{-1}$

Závislost retenčního času N-demethylinkomycinu na koncentraci pufru (dihydrogenfosforečnan draselný) v rozmezí $2 - 5 \text{ mmol l}^{-1}$ byla testována v dalším experimentu, výsledky jsou uvedeny v tab. 4.18.

Tab 4.18: Vliv iontové síly na analýzu N-demethylkomycinu

$c, \text{KH}_2\text{PO}_4$ (mmol dm^{-3})	t_r (min)	c, NDL ($\mu\text{g ml}^{-1}$)*
2,0	15,55	72,28
2,2	15,58	72,73
2,5	15,57	71,08
5,0	15,53	69,83
průměr	15,56	71,48
SD	0,02	1,30
RSD (%)	0,14	1,82

*změřená koncentrace roztoku N-demethylkomycinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Z údajů v tab. 4.18 lze učinit závěr, že vliv iontové síly na retenční čas i naměřenou koncentraci N-demethylkomycinu je minimální.

Posledním parametrem, který byl testován v rámci robustnosti metody je objem přidaného acetonitrilu k roztoku KH_2PO_4 (pufru). Ke 100 ml pufru je přidáváno 10 ml acetonitrilu. Při tomto kroku může dojít k nepřesnému odměření objemu acetonitrilu. Proto byl standardní postup srovnán s případem, kdy bylo ke 100 ml pufru přidáno 9 resp. 11 ml acetonitrilu. Výsledky pokusu jsou uvedeny v tab. 4.19.

Tab. 4.19: Vliv přídavku acetonitrilu k pufru na analýzu N-demethylkomycinu

V (ml)*	t_r (min)	c ($\mu\text{g ml}^{-1}$)**
9	16,04	72,29
10	15,62	71,05
11	15,35	74,01
průměr	15,67	72,45
SD	0,04	1,49
RSD (%)	2,22	2,05

*objem přidaného acetonitrilu k pufru

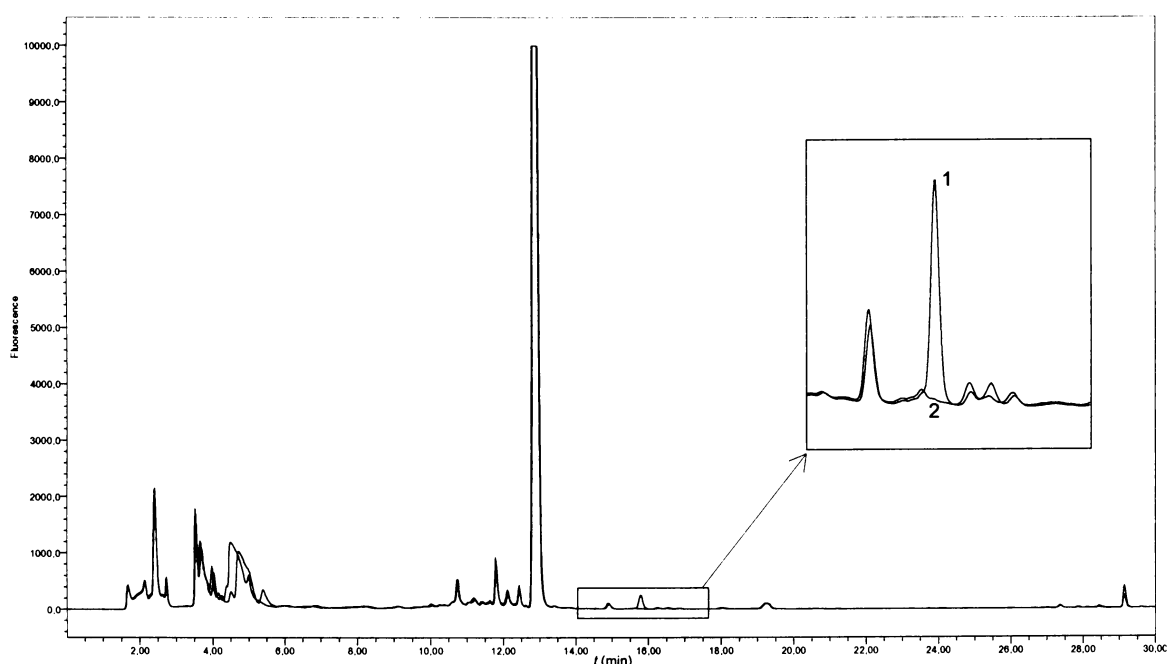
** změřená koncentrace roztoku N-demethylkomycinu v matrici B₂1 o nominální koncentraci 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$

Z výsledků vyplývá, že sledovaný parametr neovlivňuje retenci ani naměřenou koncentraci N-demethylinkomycinu z více než 5 %.

Z hlediska všech studovaných parametrů je metoda stanovení N-demethylinkomycinu robustní. Parametrem, který nejvíce ovlivňuje retenční čas i naměřenou koncentraci je objem přidávaného acetonitrilu k pufru. Proto je třeba věnovat při tomto kroku přípravy mobilní fáze zvýšenou pozornost.

4.2.6 Aplikace metody (reálné vzorky)

Byly analyzovány 3 reálné vzorky (X12, D1, N12) a v žádném nebyl N-demethylinkomycin prokázán. To koreluje se skutečností, že u kmenů odpovídajícím těmto vzorkům, byl inaktivován gen, který je zodpovědný za tu část biosyntézy předcházející vzniku N-demethylinkomycinu. Nepřítomností N-demethylinkomycinu byla potvrzena úspěšná inaktivace daného genu lmb X, lmb D a lmb N. Pro ilustraci je na obr. 4.15 znázorněn překryv chromatogramu vzorku D1 a vzorku D1 s přidavkem N-demethylinkomycinu o konečné koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Obr. 4.15: Překryv chromatogramu vzorku D1 a vzorku D1 obsahující N-demethylinkomycin o koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

1 – vzorek D1 + N-demethylinkomycin $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, pík N-demethylinkomycinu

2 – vzorek D1

derivatizace: 30 mg ml^{-1} NBD-Cl, $55 \text{ }^\circ\text{C}$; 2 h; HPLC analýza: metoda 3

5 ZÁVĚR

V této diplomové práci byly vyvinuty účinné chromatografické metody stanovení 4-propylprolinu a N-demethyllinkomycinu, prekurzorů linkomycinu v jeho biosyntetické dráze. Tyto analyty byly stanoveny v kultivačním médiu *Streptomyces lincolnensis*. Metody jsou založeny na předkolonové derivatizaci obou analytů a separaci pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Dosažené parametry analytických metod (především hodnoty LOD a LOQ) jsou na úrovni, která spolehlivě postačuje ke sledování koncentračních hladin analytů v kultivačním médiu za účelem studia funkce proteinů účastnících se biosyntetické dráhy linkomycinu.

Přítomnost 4-propylprolinu byla prokázána ve dvou reálných vzorcích kultivačního média *Streptomyces lincolnensis* s inaktivovaným genem *lmb N* a *lmb D*. Přítomnost N-demethyllinkomycinu v žádném reálném vzorku prokázána nebyla, což je v souladu s hypotézou vycházející z předpokladu, že byl inaktivován gen, který je zodpovědný za část biosyntézy předcházející vzniku N-demethyllinkomycinu.

Metody budou nadále využívány jako součást studia biosyntetické dráhy linkomycinu.

Použitá literatura

- [1] Shiau-Ta C., Manis J.J., McWethy S.J., Patt T.E., Witz D.F., Wolf H.J., Wovcha M.G.: Fermentation, Biosynthesis, and Molecular Genetics of Lincomycin, *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. 2nd edition, Dekker, New York 1997, p. 165 – 186
- [2] Brahme N.M., Gonzales J.E., Rolls J.P., Hessler E.J., Mizesak 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)
- [3] Brahme N.M., Gonzales J.E., Rolls J.P., Hessler E.J., Mizesak S., Hurley L.H.: Biosynthesis of the lincomycins. Studies using stable isotopes on the biosynthesis of methylthiolincosaminide moiety of lincomycin A, *Journal of the American Chemical Society*, **106**, 7878 – 7883 (1984)
- [4] Olšovská J., Jelínková M., Man P., Koběřská 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**, 214 – 220 (2007)
- [5] Olšovská J., Novotná J., Flieger M.: Assay of tyrosine hydroxylase based on high-performance liquid chromatography separation and quantification of L-dopa and L-tyrosine, *Bioanalytical Chromatography*, v tisku
- [6] Yurek D.A., Kuo M.S., Li G.P.: Assay of methylthiolincosamidine in fermentations by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, **502**, 184 – 188 (1990)
- [7] <http://esc.syrres.com/interkow/webprop.exe?CAS=147-85-3> [cit. 20.2.2007]

- [8] Guzman NA, Moschera J., Iqbal K., Malick AW: A quantitative assay for the determination of proline and hydroxyproline by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography*, **15** (6-7), 1163 – 1177 (1992)
- [9] Liang H., Xue J., Wu YY.: A rapid capillary electrophoresis with electrochemiluminescence method for the assay of human urinary proline and hydroxyproline. *Luminescence*, **20** (4-5), 287 – 291 (2005)
- [10] Kugler F., Graneis S., Schreiter PPY, Stinzing FC, Carle R.: Determination of free amino compounds in betalainic fruits and vegetables by gas chromatography with flame ionization and mass spectrometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54** (12), 431 – 4318 (2006)
- [11] Hanko P., Rohrer J.S.: Determination of amino acids in cell culture and fermentation broth media using anion-exchange chromatography with integral pulsed amperometric detection. *Analytical Biochemistry*, **324** (1), 29 – 39 (2004)
- [12] Cataldi T.R.I., Nardiello D.: Determination of free proline and monosaccharides in wine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3737 – 3742 (2003)
- [13] Kok W. Th., Brinkman U. A. Th., Frei R. W.: Amperometric detection of amino acids in high-performance liquid chromatography with a copper electrode. *Journal of Chromatography*, **256** (1), 17 – 26 (1983)
- [14] Ikehara T., Habu N., Nishimo I., Kamimori H.: Determination of hydroxyproline in rat urine by high-performance liquid chromatography with electrogenerated chemiluminescence detection using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II), *Analytica Chimica Acta*, **536** (1-2), 129 – 133 (2005)
- [15] Davydova E. G., Kotova D. L., Krysanova T. A., Selemenev V.F.: Spectrofotometric determination of proline in aqueous solutions. *Journal of Analytical Chemistry*, **60** (8), 710 – 713 (2005)

- [16] Lavi L. E., Holcenberg J. S.: Sensitive analysis of asparagine and glutamine in physiological fluids and cells by precolumn derivatization with phenylisothiocyanate and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **377**, 155 – 163 (1986)
- [17] Yaegaki K., Tonzetich J., Ng A.S.K.: Improved high-performance liquid chromatography method for quantitation of proline and hydroxyproline in biological materials, *Journal of Chromatography*, **356** (1), 163 – 170 (1986)
- [18] Bernal J.L., Nozal M.J., Toribio L., Diego J.C., Ruiz A.: A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acids profiles in honey, *Journal of Separation Science*, **28**, 1039 – 1047 (2005)
- [19] Alaiz M., Navarro J. L., Girón J., Vioque E.: Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate, *Journal of Chromatography*, **591** (1-2), 181 – 186 (1992)
- [20] Bachmann E. W., Frei J., Muehleemann M.: Determination of amino acids in human plasma by high-pressure liquid chromatography, *Chromatographia*, **12** (6), 345 – 348 (1979)
- [21] Fekkes D.: State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples, *Journal of Chromatography B*, **682**, 3 – 22 (1996)
- [22] Friedman M.: Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52** (3), 385 – 406 (2004)
- [23] Cunico R.L., Schlabach T.: Comparison of ninhydrin and *o*-phthalaldehyde post-column detection techniques for high-performance liquid chromatography of free amino acids, *Journal of Chromatography*, **266**, 461 – 470 (1983)

- [24] Evgen'ev M.I., Evgen'eva I.I.: Selective spectrophotometric determination of proline and tryptophan as 4,6-dinitrobenzofuroxan derivatives in the presence of other amino acids, *Journal of Analytical Chemistry*, **55** (8), 741 – 745 (2000)
- [25] Lehtonen P.: Determination of amines and amino acids in wine - A review, *American Journal of Enology and Viticulture*, **47** (2), 127 – 133 (1996)
- [26] Herbert P., Barros P., Ratola N., Alves A.: HPLC determination of amino acids in musts and port wine using OPA/FMOC derivatives, *Journal of Food Science*, **65** (7), 1130 – 1133 (2000)
- [27] Himuro A., Nakamura H., Tamura Z.: Fluorometric determination of secondary amines by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization, *Journal of Chromatography*, **264** (3), 423 – 433 (1983)
- [28] Cooper J.D.H., Lewis M.T., Turnell D.C.: Pre-column *o*-phthaldehyde derivatization of amino acids and their separation using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **285**, 484 – 489 (1984)
- [29] Wu G.: Determination of proline by reversed-phase high-performance liquid chromatography with automated pre-column *o*-phthaldialdehyde derivatization, *Journal of Chromatography*, **641**, 168-175 (1993)
- [30] Czauderma M., Kowalczyk J., Niedzwiedska K.M., Wasoeska I.: A highly efficient method for determination of some amino acids and glutathione by liquid chromatography, *Journal of Animal and Feed Sciences*, **12** (1), 199 – 215 (2003)
- [31] Oray B., Lu H.S., Gracy R.W.: High-performance liquid chromatographic separation of Dns-amino acid derivatives and applications to peptide and protein structural studies, *Journal of Chromatography*, **270**, 253 – 266 (1983)
- [32] Tapuhi Y., Schmidt D.E., Lindner W., Karger B.L.: Dansylation of amino acids for high-performance liquid chromatography analysis, *Analytical Biochemistry*, **115**, 123 – 129 (1981)

- [33] Inoue H., Iguch H., Tsuruta Y.: Fluorometric determination of N-terminal prolyl dipeptides, proline and hydroxyproline in human serum by pre-column high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride, *Journal of Chromatography B*, **757** (2), 369 – 373 (2001)
- [34] Einarsson S., Josefsson B., Lagerkvist S.: Determination of amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, **282**, 609 – 618 (1983)
- [35] Gustavsson B., Betnér I.: Fully automated amino acid analysis for protein and peptide hydrolysates by precolumn derivatization with 9-fluorenyl methylchloroformate and 1-aminoadamantane, *Journal of Chromatography*, **507**, 67 – 77 (1990)
- [36] Bosch L., Alegría A., Farré R.: Application of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the RP-HPLC determination of amino acids in infant food, *Journal of Chromatography B*, **831** (1-2), 176 – 183 (2006)
- [37] Carisano A.: Rapid and sensitive method for the determination of proline by reversed-phase high-performance liquid chromatography with automated pre-column fluorescence derivatization, *Journal of Chromatography*, **318** (1), 132 – 138 (1985)
- [38] Ikeda M., Sorimachi K., Akimoto K., Okazaki M., Sunagawa M., Niwa A.: Analysis of hydroxyproline in urine by high-performance liquid-chromatography after dabsyl-chloride derivatization, *Amino Acids*, **8** (4), 401 – 407 (1995)
- [39] Shi Y.W., Ming Y.F., Wang C.P., Zhao X., Zhang R., You J.M.: Determination of amino acids from hydrolyzed bovine serum albumin by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with fluorescence and electrospray ionization detection, *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **34** (4), 503 – 507 (2006)

- [40] Hofmann A. F.: Efficient extraction of bile acid conjugates with tetraheptylammonium chloride, a liquid ion exchanger, *Journal of Lipid Research*, **8**, 55 – 58 (1967)
- [41] <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/jsp/common/PhysicalProperties.jsp>; [cit. 25.4.2007]
- [42] Luo W., Yin B., Ang C.Y.W., Rushing L., Thompson H.C.: Determination of lincomycin residues in salmon tissues by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection, *Journal of Chromatography B*, **687**, 405 – 411 (1996)
- [43] Moats W.A.: Determination of lincomycin in milk and tissues by reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**, 1812 – 1816 (1991)
- [44] 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**, 84 – 88 (2006)
- [45] 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**, 161 – 166 (1998)
- [46] Douša M., Sikač 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**, 981 – 986 (2006)
- [47] Crellin K.C., Sible E., J. van Antwerp: 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**, 281 – 311 (2003)

- [48] 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**, 651 – 659 (2004)
- [49] Sin D.W.M., Ho Clare, Wong Y.C., S.K. Ho, Alec C.B. Ip.: Simultaneous determination of lincomycin and virginiamycin M1 in swine muscle, liver and kidney by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **517**, 39 – 45 (2004)
- [50] Thomson T.S., Noot D.K., Calvert J., Pernal 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**, 241 – 250 (2003)
- [51] Herr R.R., Slomp G.: Lincomycin. II. Characterization and gross structure, *Journal of the American Chemical Society*, **89**, 2444 – 2447 (1967)
- [52] R.D.Birkenmeyer and L.A. Dolak: Lincomycin XIII. N-dealkylation of linkomycin and its analogs, *Tetrahedron Letters*, **58**, 5049 – 5051 (1970)
- [53] Gust B., Challis G.L., Fowler K., Kieser T., Chater K.F.: PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 1541 – 1546 (2003)
- [54] Miller L.C., Miller J.N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. Ellis Horwood, New York 1992
- [55] Shah V.P., Midha K.K., Findlay J.W.A., Hill H.M., Hulse J.D., McGilveray I.J., McKay G., Miller K.J., Patnaik R.N., Powell M.L., Tonelli A., Viswanathan C.T., Yacobi A.: Bioanalytical method validation – a revisit with a decade of progress, *Pharmaceutical Research*, **17**, 1551 – 1557 (2000)

Poděkování

Rád bych poděkoval Janě Olšovské a Karlovi Nesměrákovi za vedení při práci na zadaném tématu, za mnoho užitečných rad, za trpělivost a pomoc při psaní této práce. Dále děkuji spolupracovníkům za vytvoření dobré nálady v laboratoři, především Zdeňce Křesinové a Tereze Tylové. Děkuji také celému týmu Laboratoře sekundárního metabolismu, zejména Janu Kopeckému, Markétě Marečkové, Jitce Novotné, Daně Ulanové a Yvoně Smutné.

Můj největší dík patří rodičům, kteří mi umožnili studium na vysoké škole, celé mé rodině a kamarádům, kteří mě během studia podporovali a byli mi nablízku.