UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

STANOVENÍ SIBIROMYCINU METODOU UHPLC

DETERMINATION OF SIBIROMYCIN BY UHPLC METHOD

Rigorózní práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2012 Mgr. Ivana Šestáková

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 14. 3. 2012 .....

KLÍČOVÁ SLOVA: sibiromycin, SPE, UHPLC, MS

PŘEDMĚTOVÁ HESLA: izolace a stanovení sibiromycinu, produkce sibiromycinu na různých fermentačních médiích

ABSTRAKT

Za účelem stanovení sibiromycinu ve fermentačním médiu *Streptosporangium sibiricum* byla vyvinuta nová analytická separační metoda s využitím ultraúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) s UV detekcí. Nově vyvinutý postup extrakce na tuhé fázi založený na kationtové výměně sloužil k prekoncentraci a přečištění fermentačního média obsahujícího sibiromycin před vlastní UHPLC analýzou. Metoda byla validována a byla prokázána linearita v koncentračním rozsahu 3,9-250,0 μg/ml s korelačním koeficientem 0,999 a výtěžností v rozmezí 71,66±3,55 % až 74,75±5,18 %. V rámci testování meze stanovitelnosti bylo dosaženo hodnoty 0,18 μg/ml s přesností vyjádřenou relativní směrodatnou odchylkou (RSD) 9,6 % a správností 97,6 %. Vyvinutá metoda pomohla ke zjištění vlivu 12-ti různých fermentačních médií na produkci sibiromycinu a navíc také dokázala tvorbu přírodních analogů sibiromycinu, jež byly charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

ABSTRACT

A new separation and quantification method using ultra high-performance liquid chromatography (UHPLC) with UV detection was developed for the detection of sibiromycin in fermentation broth of *Streptosporangium sibiricum*. The solid phase extraction method based on cation-exchange was employed to pre-concentrate and purify fermentation broth containing sibiromycin prior to UHPLC analysis. The whole assay was validated and showed a linear range of detector response for the quantification of sibiromycin in a concentration from 3.9 to 250.0 μg/ml, with correlation coefficient of 0.999 and recoveries rating from 71.66±3.55 % to 74.75±5.18 %. Method limit of quantification of the assay was determined as 0.18 μg/ml and was verified with resulting RSD of 9.6 % and accuracy of 97.6 %. The developed assay was used to determine the sibiromycin production in 12 different fermentation broths. Moreover, several natural sibiromycin analogues/derivatives were described with pilot characterization using off-line mass spektrometry.

OBSAH

1 ÚVOD 6

1.1 Úvodní slovo o sibiromycinu 6

1.2 Sibiromycin a další pyrrolo-1,4-benzodiazepiny 7

1.3 Biologické účinky sibiromycinu 8

1.4 Metody stanovení sibiromycinu 8

2 VÝSLEDKY A DISKUZE 10

2.1 Vývoj a optimalizace extrakčních metod 10

2.2 Vývoj a optimalizace chromatografických metod 12

2.3 Validace UHPLC metody 14

2.3.1 Kalibrační křivka 14

2.3.2 Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) 14

2.3.3 Přesnost a správnost metody 15

2.3.4 Výtěžnost 15

2.3.5 Stabilita 15

2.4 Produkce sibiromycinu a jeho derivátů v závislosti na typu média 16

3 ZÁVĚR 19

4 LITERATURA 20

5 PŘÍLOHY 22

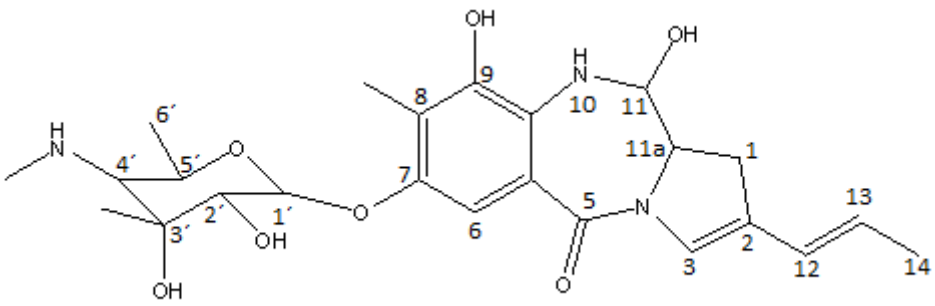
1 ÚVOD

1.1 Úvodní slovo o sibiromycinu

V současnosti je známa velká řada látek s antibiotickými účinky, avšak jen malé množství z nich je využíváno v praxi. Tato skutečnost a dále také nepřiměřené zacházení s antibiotiky vede k postupnému vytváření rezistence bakterií na již zavedená a používaná antibiotika. Vzhledem k této situaci je třeba věnovat více pozornosti studiu nových látek, které by mohly vést k rozšíření možností léčby bakteriálních onemocnění.

Sibiromycin je přírodní antibiotikum produkované aktinomycetami vykazující nejen předpokládané antibakteriální účinky, ale také účinky protinádorové. Nevýhodou tohoto antibiotika a důvodem prozatímní nevyužitelnosti v praxi je zjištěný kardiotoxický efekt na pokusných zvířatech.[1]

Z hlediska chemické struktury (Obr. 1) je řazen do skupiny pyrrolo-1,4-benzodiazepinových antibiotik (PBD), jejichž společným znakem z pohledu chemické struktury je systém 3 kruhů – aromatický, pyrrolový a kruh s chemickou strukturou 1,4-diazepin-5-on.



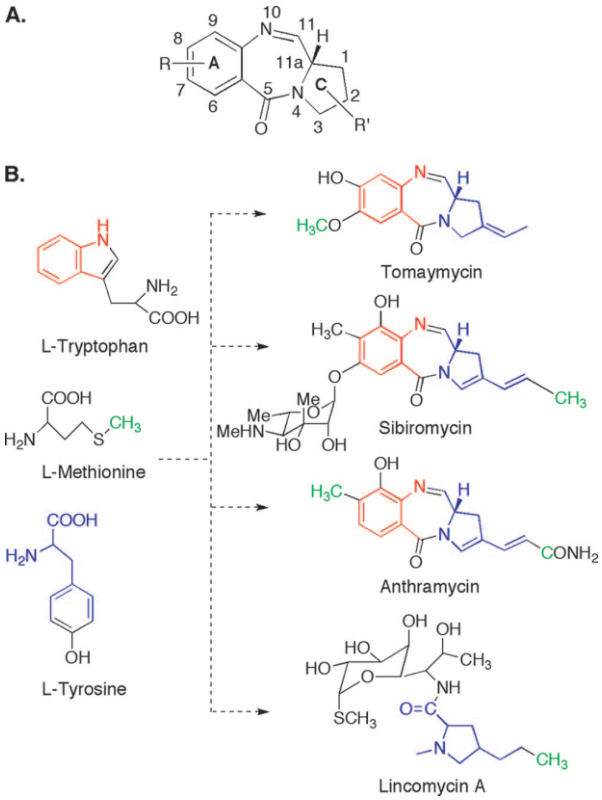
Obr. 1 Chemická struktura sibiromycinu popsaná v roce 1988 autory Leber a kol.[2]

Z chemických a fyzikálních vlastností lze uvést dobrou rozpustnost v methanolu, acetonitrilu a dichlormethanu a nerozpustnost ve vodě při pH 7. Sibiromycin je bílý prášek, který se vyznačuje stabilitou jak v krystalické formě, tak i v 100% roztoku methanolu. Pro látku jsou v UV spektru charakteristická dvě maxima (230 a 310 nm).

1.2 Sibiromycin a další pyrrolo-1,4-benzodiazepiny

První zmínky o sibiromycinu a jeho zařazení byly zaznamenány autory Gause a kol. v roce 1969. Antibiotikum produkované aktinomycetou bylo izolováno na Sibiři a následně nazváno sibiromycin. Producentem sibiromycinu byl na základě morfologických a fyziologických znaků označen rod *Streptosporangium* a kmen *Streptosporangium sibiricum.*[3] V roce 1996 využili vědci pokroku v oboru molekulárních technik a na základě 16S rDNA analýz původní zařazení do rodu *Streptosporangium* zpochybnili.[4]

Jak již bylo uvedeno, základní skelet sibiromycinu odpovídá chemické struktuře pyrrolo-1,4-benzodiazepinů. Do této skupiny antibiotik se řadí také anthramycin, sibanomycin, tomaymycin, neothramycin, dextrochrysin, porothramycin a další. Společným rysem těchto látek je tvorba kovalentní vazby s guaninem v malém žlábku DNA. Tato vazba je umožněna přítomností asymetrického centra na C11, což dává sloučenině pravotočivé vinutí. Důsledkem tvorby těchto aduktů je inhibice syntézy DNA.[1, 5]



Při testování vybraných PBD bylo zjištěno, že sibiromycin vykazuje nejvyšší vazebnou afinitu k DNA.[6] Porovnávací studie anthramycinu, tomaymycinu a sibiromycinu ukazuje, že tyto látky naopak neposkytují téměř žádnou reakci s RNA či proteiny a že mají vyšší afinitu k nativní DNA oproti denaturované DNA.[5]

Pro další výzkum je nutná znalost biosyntetické dráhy PBD. Podobnost PBD a linkomycinu (Obr. 2) vedla k objasnění vzniku jejich hydropyrrolové části z L-tyrosinu. Biosyntetická dráha antranilové části byla navrhnuta kynureninovou cestou z L-tryptofanu.[5,7,8,9,10]

Obr. 2 Chemická struktura pyrrolo-1,4-benzodiazepinů (A). Metabolické prekurzory tomaymycinu, sibiromycinu, anthramycinu a linkomycinu A (B)
Pozn. Převzato z publikace[10]

1.3 Biologické účinky sibiromycinu

Sibiromycin, stejně jako mnoho dalších pyrrolo-1,4-benzodiazepinů, se vyznačuje kromě antibiotických účinků také protinádorovou aktivitou. Značným přínosem a velkou výhodou pro jeho případné využití je malý vliv na kostní dřeň. Při klinických výzkumech na myších bylo testováno protinádorové působení na různé typy nádorů, některé z nádorů se po několika dávkách sibiromycinu zcela ztratily. V rámci klinických studií byl pozorován vliv dávky sibiromycinu na změny funkce jater, srdce a ledvin, přičemž byl objeven kardiotoxický efekt, který je způsoben přítomností hydroxylové skupiny na uhlíku C9.[1] Tento negativní jev je příčinou dosavadní nevyužitelnosti sibiromycinu v praxi. S využitím možnosti tvorby geneticky manipulovaných kmenů a dokonalou znalostí biosyntetické dráhy by mohly být produkovány deriváty sibiromycinu bez uvedeného toxického efektu.

1.4 Metody stanovení sibiromycinu

Publikace[3] z roku 1969 sice zveřejňuje první poznatky o sibiromycinu, o jeho chemické struktuře se však dozvídáme v práci vydané o tři roky později.[11] Autoři uvádí metody izolace sibiromycinu z fermentačního média, postupy přečištění a částečnou charakterizaci chemické struktury. Při tomto výzkumu bylo zjištěno, že sibiromycin lze získat extrakcí v systému kapalina-kapalina (LLE) z fermentačního média chloroformem, ethylacetátem a dichlormethanem. Pro rutinní stanovení čistoty takto získaného produktu byla používána metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC). Publikace dále uvádí, že sibiromycin poskytuje pozitivní barevné reakce s ninhydrinem, chloridem železitým a s diazosloučeninami a dále je odbarvován při reakci s manganistanem draselným a roztokem Br_2-H_2O, což bylo využíváno k detekci látky. Chemická struktura byla částečně charakterizována pomocí UV, IČ a NMR.[11]

V uvedené publikaci[11] byla poprvé zmiňována chemická struktura sibiromycinu s relativní molekulovou hmotností 473,2 a sumárním vzorcem $C_{24}H_{31}N_3O_7$. V následujících letech byla ve struktuře sibiromycinu upřesňována pozice cukerného zbytku, v roce 1982 bylo prokázáno, že přírodní produkt na rozdíl od syntetického tvoří přednostně C7 vazbu oproti vazbě C9. Pokud pomineme tuto skutečnost, chemické struktury se v literatuře do této doby shodují. Zlom přichází v roce 1988, kdy Leber a spol. izolovali sibiromycin ze stejného kmene jako vědci v publikaci z roku 1982, avšak popisují chemickou strukturu sibiromycinu (Mr=475,2), která se liší v absenci dvojné vazby (C1 – C11a) v pyrrolové části.[2]

V roce 2009 vyšla publikace týkající se biosyntetické dráhy sibiromycinu. Poprvé se zde objevuje HPLC separace sibiromycinu s UV a MS detekcí. Jedná se o gradientovou metodu v reverzním módu na koloně Zorbax Eclipse XDB-C8 s použitím mobilní fáze o složení kyselina trifluoroctová (TFA)/methanol (MeOH) a UV detekcí při 230 a 310 nm. MS detekce byla měřena v pozitivním módu na průletovém analyzátoru s elektrosprejovou ionizací (ESI). Tato práce však neuvádí limity detekce a kvantifikace metody.[10]

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat UPLC metodu s UV detekcí pro rutinní stanovení sibiromycinu. Dále byla v průběhu této práce vyvíjena prekoncentrační SPE metoda, která pomohla ke zjištění rozdílné produkce sibiromycinu na různých typech fermentačních médií.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST viz Příloha

2 Výsledky a diskuze

2.1 Vývoj a optimalizace extrakčních metod

V minulosti, jak je známo z literatury,[11] bylo k izolaci sibiromycinu z fermentačního média využíváno extrakce v systému kapalina-kapalina (LLE). Na základě těchto poznatků vedly první kroky k testování některých rozpouštědel uvedených v publikaci, následně se přistoupilo k prověření dalších běžných organických rozpouštědel za účelem získání optimální LLE metody s dostatečnou výtěžností a schopností přečištění výsledného produktu. Ze zkoušených rozpouštědel lze uvést ethylacetát, diethylether, hexan a dichlormethan. V ethylacetátu a dichlormethanu je sibiromycin rozpustný, větší výtěžnosti při porovnání těchto dvou rozpouštědel bylo dosaženo při extrakci dichlormethanem, který byl následně zvolen vhodným rozpouštědlem pro extrakční postup. Zjištěná nerozpustnost sibiromycinu v rozpouštědlech diethylether a hexan dala možnost jejich využití k eliminaci nežádoucích nečistot ve fermentačním médiu. Z důvodu vyšší schopnosti přečištění byl pro tyto účely vybrán hexan. Důležitým parametrem zjištěným při vývoji této LLE metody bylo dodržení pH fermentačního média v rozmezí hodnot 7,0-7,7. Výtěžnost extrakčních pokusů byla podložena UHPLC analýzami jednotlivých frakcí.

Výsledný postup LLE metody byl následující:

1. extrakce fermentačního média hexanem za účelem přečištění (2x opakováno)
2. extrakce sibiromycinu z fermentačního média do dichlormethanu, v němž je sibiromycin rozpustný (3x opakováno)
3. spojení a odpaření frakcí dichlormethanu

Tento postup bylo výhodné využívat při zpracování vyššího množství fermentačního média. Proces LLE je však v dnešní době nahrazován metodou extrakce na tuhé fázi (SPE), jež má oproti LLE řadu výhod, které budou uvedeny níže při porovnání obou extrakčních technik.

SPE metoda byla vyvíjena především s cílem optimalizovat rutinní metodu, která by zajistila rychlé získání přečištěného a prekoncentrovaného sibiromycinu z fermentačního média. Při vývoji této extrakční techniky je prvním krokem k úspěchu správná volba sorbentu,

možnosti výběru jsou v dnešní době opravdu široké. V první řadě je třeba zvážit povahu látky a její vlastnosti. Bazická povaha sibiromycinu vedla k předpokladu, že dobré výsledky by mohly poskytovat SPE kolonky založené na kationtové výměně, což se v závěru potvrdilo. Jednotlivé kroky extrakčního postupu na kolonkách Oasis MCX prošly celou řadou změn, než bylo docíleno SPE metody, která by byla použitelná pro rutinní měření.

Výsledný postup SPE metody:

OASIS MCX 60 mg (Waters)

1 ml MeOH, 1 ml H_2O

3 ml fermentačního media (sibiromycin)

3 ml H_2O

3 ml MeOH

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

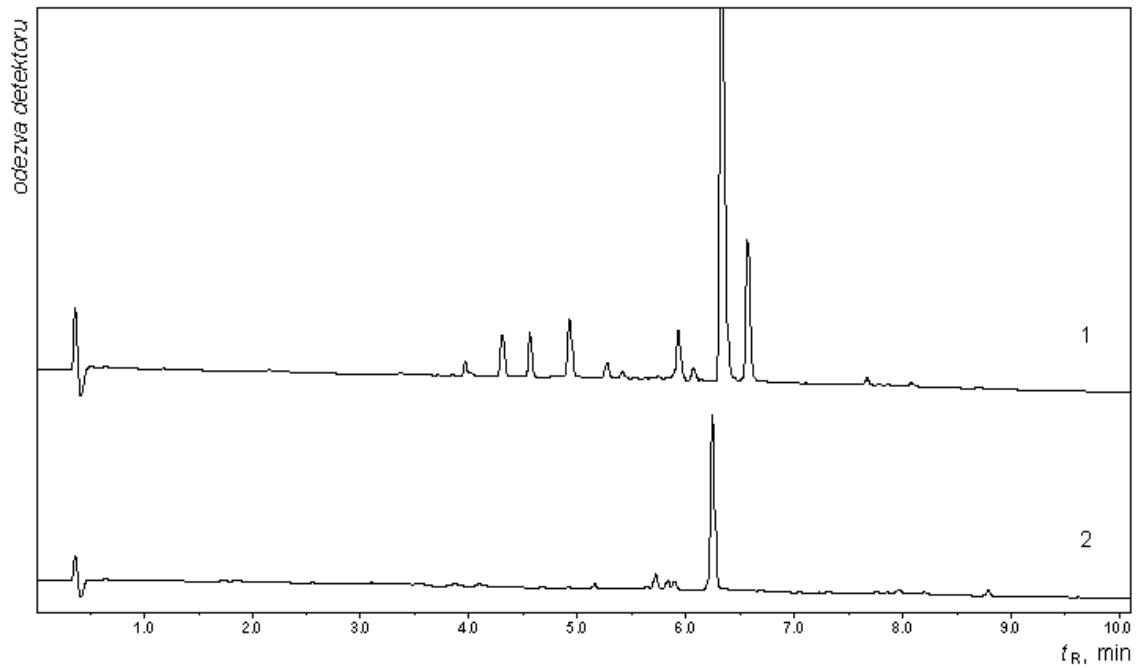
eluce: 3 ml NH_4OH – MeOH (1:99, *v/v*)

Při pohledu na postupy obou extrakčních technik (LLE a SPE) lze vyvodit několik výhod SPE metody. V první řadě SPE lze použít jako rutinní metodu využitelnou pro běžná sériová stanovení a to především díky rychlosti a snadnosti provedení. Dále také spotřeba rozpouštědel je oproti LLE podstatně nižší. Navíc SPE poskytuje mnohem lepší výsledky ve výtěžnosti a reprodukovatelnosti metody (Tab. 1).

Tab. 1 Výtěžnost SPE a LLE metody

Metoda	Koncentrace (μg/ml)	Výtěžnost a reprodukovatelnost (%)
SPE	5	71,66 ± 3,55
	10	74,75 ± 5,18
LLE	5	31,67 ± 21,07
	10	35,34 ± 21,66

Při prvním pohledu na Obr. 3, který zobrazuje chromatogramy analyzovaného sibiromycinu získaného oběma extrakčními technikami, by se dalo usuzovat, že LLE poskytuje vyšší schopnost přečištění produktu. Avšak jak bylo v této práci zjištěno, takové přečištění není zcela žádoucí, jelikož způsobuje ztrátu významných derivátů sibiromycinu, které byly v dřívějších pracích opomenuty vzhledem k možnosti využít pouze techniku LLE nikoliv nově vyvinutou SPE.



Obr. 3 Porovnání UPLC analýzy sibiromycinu izolovaného pomocí SPE a LLE

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

Chromatogramy: 1. Izolace sibiromycinu pomocí SPE

2. Izolace sibiromycinu pomocí LLE

2.2 Vývoj a optimalizace chromatografických metod

Cílem práce bylo vyvinout rychlou a účinnou UHPLC metodu pro rutinní analýzy a dále preparativní HPLC metodu pro přečištění sibiromycinu zpracovaného LLE technikou za účelem získání standardu, který nebyl na trhu dostupný. Optimalizaci obou metod předcházelo testování různých typů kolon, mobilních fází a podmínek.

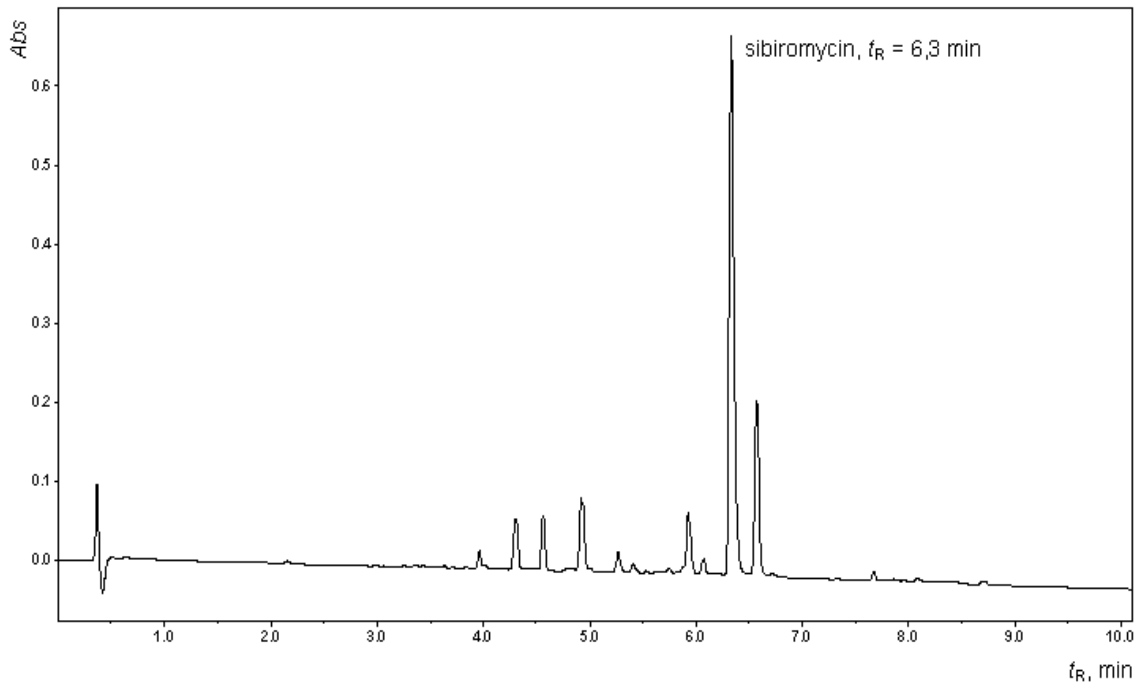
V první řadě se přistoupilo k vývoji UHPLC metody, která byla zapotřebí k rychlé kontrole kultivačních pokusů. Na počátku testování této metody stála správná volba stacionární a mobilní fáze. Z několika testovaných UHPLC kolon byla vybrána kolona mající širokou oblast pH stability a poskytující nejlepší separaci. Mobilní fázi bylo třeba směřovat do kyselé oblasti, jelikož z provedené pH závislosti byla zjištěna značná nestabilita sibiromycinu v alkalickém prostředí. Nejprve byla vyvinuta gradientová metoda se složením mobilní fáze acetonitril a pufr 1mM mravenčan amonný o pH 4, která se však neosvědčila pro příliš rychlou eluci sibiromycinu (t_R = 2,2 min) a s tím spojenou nedostatečnou separaci. Následující volbou byla záměna acetonitrilu za methanol pro jeho nižší eluční sílu a mravenčanu amonného za iontově-párové činidlo 0,1% kyselinu trifluoroctovou (TFA). Po

úpravě gradientu do finální podoby byla zvolena teplota kolony 55 °C. Na základě analýz za optimalizovaných podmínek bylo zjištěno UV spektrum sibiromycinu s absorpčními maximy 230 a 310 nm. Výsledné UHPLC podmínky a odpovídající chromatogram jsou zobrazeny v Tab. 2 a Obr. 4.

Tab. 2 Optimalizovaná UPLC metoda

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

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



Obr. 4 UPLC chromatogram sibiromycinu analyzovaného optimalizovanou metodou

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

Pro testování jednotlivých metod a následnou validaci bylo třeba mít k dispozici standard, který však nebyl na trhu dostupný. Za účelem získání většího množství čistého sibiromycinu byla využita výše popsaná LLE, která byla výhodnější z hlediska zpracování většího objemu fermentační tekutiny. Pro následné přečištění po LLE byla zvolena preparativní kapalinová chromatografie. Znalosti získané při vývoji UHPLC metody pomohly

k snadnější optimalizaci této preparativní HPLC metody. Byla vybrána kolona Phenomenex Synergi Polar-RP (250 x 15 mm, 4 μm), na které se podařilo optimalizovat metodu s isokratickou elucí o složení mobilní fáze 1mM mravenčan amonný o pH 4 a 100% ACN (30/70, *v/v*) při průtokové rychlosti 4 ml/min, vlnové délce 230 nm a nástřikovém objemu 100 μl. Retenční čas sibiromycinu se pohyboval kolem t_R = 21 min. Po zpracování vzorku odpařením organické fáze a následnou lyofilizací vodné fáze byl získán standard o čistotě 97%.

2.3 Validace UHPLC metody

Proces validace má za úkol na základě různých parametrů prověřit správnou funkčnost metody. Validace byla prováděna dle zavedených předpisů shrnutých ve validačním protokolu[12].

2.3.1 Kalibrační křivka

Kalibrační přímka byla měřena v lineárním rozsahu 3,9–250,0 μg/ml na koncentračních hladinách 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125,0 a 250,0 μg/ml. Rovnice lineární regrese vyhodnocená z ploch píků má tvar $y = 1{,}18 \cdot 10^4 x - 1{,}13 \cdot 10^4$ s koeficientem determinace 0,999.

2.3.2 Mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ)

Nejnižší koncentrace kalibrační křivky stanovitelná s přesností do 20 % a správností v rozsahu 80-120 % je nazývána mez stanovitelnosti (LOQ). Hodnota LOQ 3,9 μg/ml byla vyhodnocena po šesti opakovaných měřeních s přesností 5,7 % a správností 92,2 %. Mez detekce je nejnižší koncentrační hladina detekovatelná danou metodou a odpovídá hodnotě 1,2 μg/ml. Takto získaná data jsou vztažena k použité instrumentaci.

Při zohlednění prekoncentrace vzorku SPE technikou lze získat limit stanovitelnosti dané metody (MLOQ). Vypočtená hodnota MLOQ 0,18 μg/ml vyjadřuje nejnižší kvantifikovatelné množství sibiromycinu ve fermentačním médiu, do výpočtu byla zahrnuta hodnota LOQ, koncentrační faktor 30 (3 ml fermentačního média zakoncentrovaná na 100 μl) a výtěžnost SPE metody 70 %.

2.3.3 Přesnost a správnost metody

Tyto parametry byly ověřovány na 3 koncentračních hladinách 3,9 (LOQ); 15,6 a 125 µg/ml po šesti opakováních. Přesnost vyjádřená ve formě relativní směrodatné odchylky (RSD) se pohybovala v rozmezí 2,2 - 5,7 % a správnost v rozsahu 92,2 – 102,5 % (Tab. 3). Hodnoty těchto parametrů potvrzují skutečnost, že metoda poskytuje přesné a správné výsledky.

Tab. 3 Vyhodnocení správnosti a přesnosti metody

Skutečná koncentrace (µg/ml)	Správnost (%)	RSD (%)
125,0	96,7	4,3
15,6	102,5	2,2
3,9	92,2	5,7

2.3.4 Výtěžnost

Pro zjištění výtěžnosti SPE metody byly prováděny extrakce vzorků o známé koncentraci přidaných do media YEME (blank). Výtěžnost SPE metody měla při koncentraci 5 µg/ml hodnotu 71,66 ± 3,55 % a na koncentrační hladině 25 µg/ml měla hodnotu 74,75 ± 5,18 %.

2.3.5 Stabilita

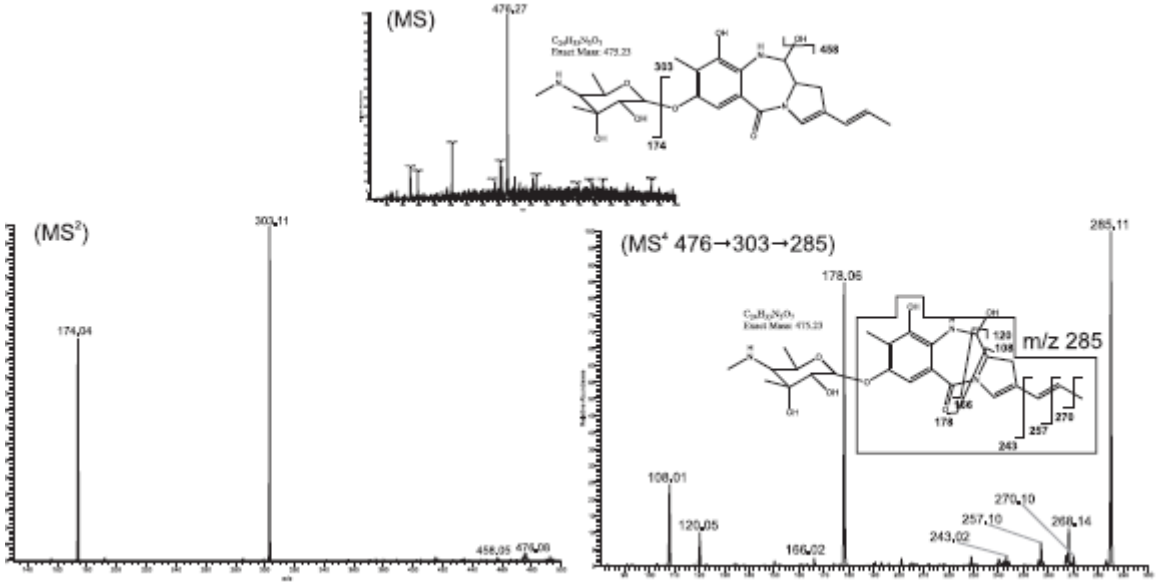
Stabilitní studie týkající se standardu sibiromycinu rozpuštěného v methanolu se týkala navození podmínek běžných při rutinní práci se vzorkem a jeho skladování. Byla hodnocena krátkodobá a dlouhodobá stabilita, přičemž krátkodobá poskytuje znalosti o stabilitě vzorku během jednoho dne skladovaného při laboratorní teplotě (25 °C) a vzorky byly měřeny v intervalu 0, 2, 4, 6, 8, 12 a 24 hod. Dlouhodobá stabilita zjišťuje stálost vzorků skladovaných při -20 °C v delším časovém období, v tomto případě po 0, 1, 2, 3, 7 a 14 dnech. Vyhodnocením těchto dat byly získány informace o značné stabilitě sibiromycinu v roztoku metanolu a z výsledků lze učinit závěr, že během běžné práce s roztokem sibiromycinu nedochází k jeho degradaci. V případě dlouhodobého skladování v mraznici může docházet k mírnému zakoncentrování roztoku.

2.4 Produkce sibirimycinu a jeho derivátů v závislosti na typu média

Již při vývoji chromatografických a extrakčních technik byly pozorovány značné odlišnosti při použití různých typů fermentačních médií. Některá z médií se vyznačovala vysokou produkcí sibiromycinu, v jiných byla produkce sibiromycinu potlačena na úkor jiných látek. Tyto poznatky nebyly z literatury známy, tudíž byla provedena studie shrnující vliv 12-ti různých fermentačních médií (M1, M2, M3, M7, M8, SM, SS, Gause, YEME, ISP4, ISPM4, BG) na produkci sibiromycinu.

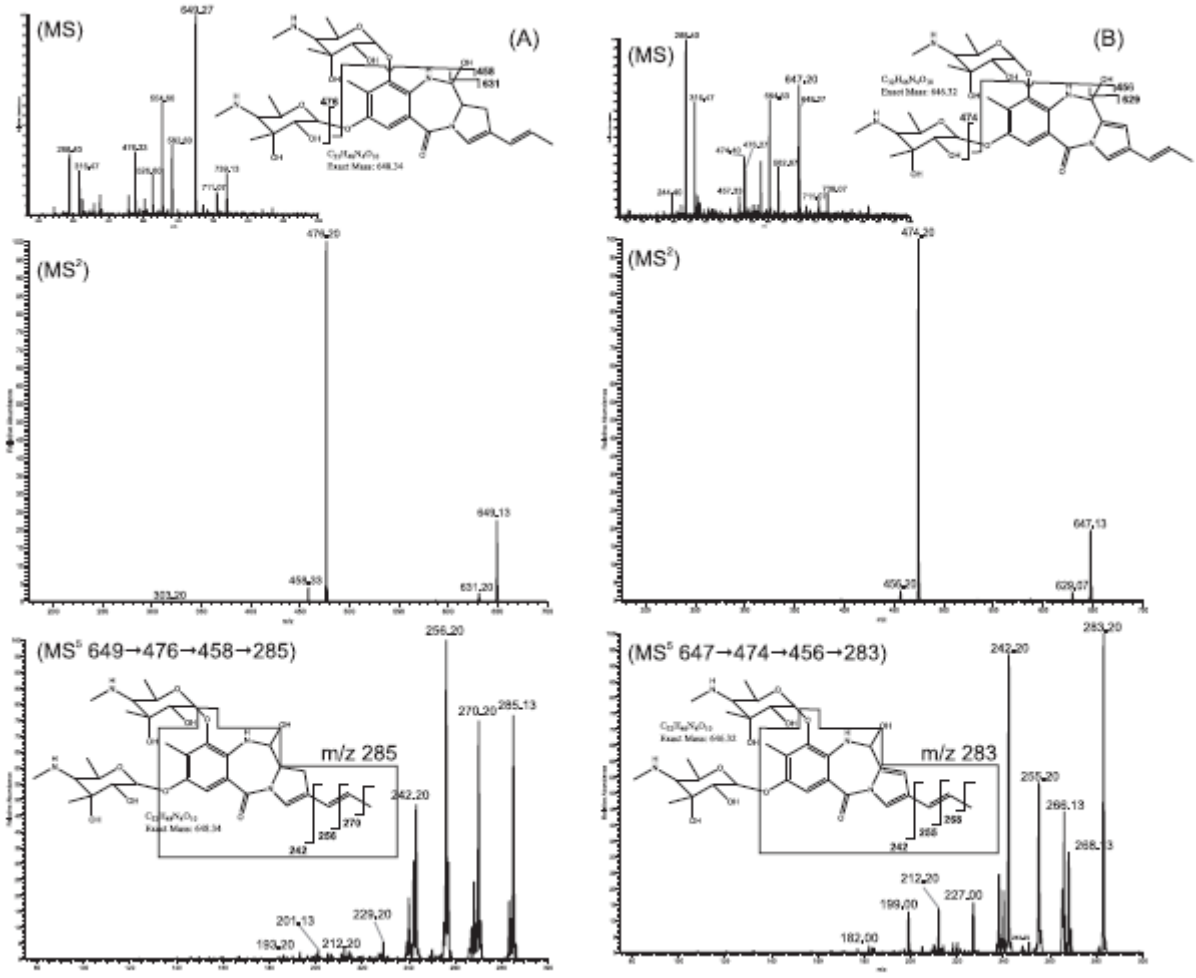
V rámci této studie byl sledován nejen vliv na produkci sibiromycinu v médiu, ale také na změny v produkci dalších dvou polárnějších látek (označení compound 1 a compound 2 bylo převzato z publikace, jež je součástí této práce). Tyto látky se staly předmětem zájmu, jelikož vykazovaly podobná absorpční maxima jako sibiromycin (230 a 310 nm). Významnou produkci sibiromycinu poskytovala média M7 a M8, naopak médium YEME lze označit jako médium s velmi nízkou produkcí sibiromycinu. V minulosti využívané Gause médium[3] poskytovalo ve srovnání s M7 a M8 přibližně čtyřikrát nižší produkci sibiromycinu. Velký rozdíl byl též v produkci sledovaných polárnějších látek (compound 1 a compound 2), v některých médiích nebyly tyto látky nalezeny (M1, M2, SM, YEME, ISPM4), ve většině ostatních převyšovalo množství compound 2 nad compound 1.

Pro potřebu identifikace zmiňovaných látek byly jednotlivé frakce během UHPLC analýzy preparovány a dále stanoveny offline MS analýzou (ESI+).



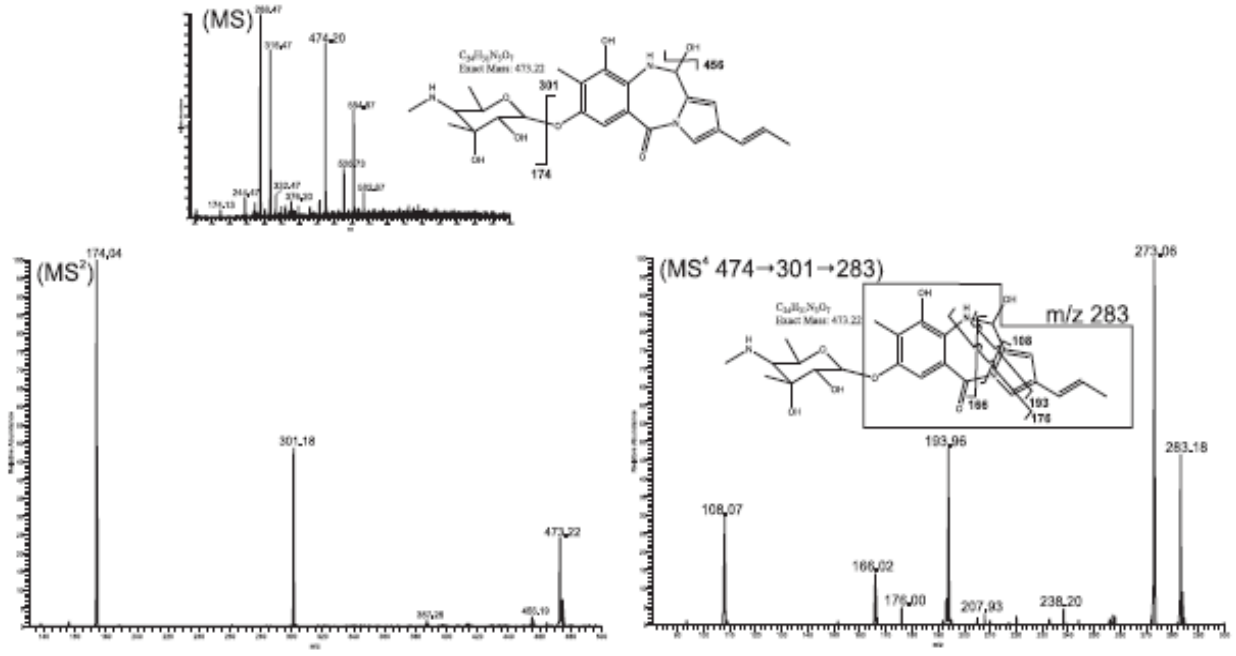
Obr. 5 MS spektrum sibiromycinu s předpokládanou fragmentací (MS^2 a MS^4)

Frakce, izolovaná a později potvrzená jako sibiromycin, měla retenční čas v UHPLC módu 6,3 min a MS analýzou poskytovala molekulární pík m/z 476,3. Struktura byla potvrzena vícenásobnou fragmentací za poskytnutí očekávaných fragmentů odpovídajících molekule sibiromycinu (Obr. 5). Frakce s označením compound 2 poskytla molekulární pík s hodnotou m/z 649,3, jehož hlavním fragmentem v MS^2 spektru byl pík s hodnotou m/z 476,3 odpovídající protonované molekule sibiromycinu (Obr. 6 A). Z interpretace těchto hmotnostních spekter se předpokládá, že frakce compound 2 odpovídá novému analogu sibiromycinu, který je navíc obohacen o cukernou složku. Frakce compound 1 je taktéž obohacena o cukernou složku, poskytuje molekulární pík s m/z 647,3 a totožnou fragmentaci jako compound 2 s rozdílem 2 hmotnostních jednotek (Obr. 6 B). Uvedené struktury však nebyly potvrzeny NMR spektroskopií vzhledem k malému množství izolovaných UHPLC frakcí.



Obr. 6 MS spektra compound 1 (A) a compound 2 (B) s předpokládanou fragmentací (MS^2 a MS^5)

Kromě výše popisovaných struktur byla mezi produkty nalezena také látka, která eluovala za sibiromycinem a která poskytovala signál m/z 474,2 (Obr. 7). Fragmentace je velmi podobná fragmentaci sibiromycinu s rozdílem 2 hmotnostních jednotek. Navrhovaná chemická struktura vycházející z fragmentačních mechanismů MS spekter se odlišuje od struktury sibiromycinu v přítomnosti dvojné vazby v poloze C1-C11a. Tato skutečnost by byla následně klíčem ke sporu o chemickou strukturu sibiromycinu (viz výše) a potvrzovala by existenci obou typů struktur.



Obr. 7 MS spektrum DH-sibiromycinu (m/z 474,2) a předpokládaná fragmentace

3 Závěr

V rámci této práce byla vyvinuta rutinní UHPLC metoda pro stanovení sibiromycinu ve fermentačním médiu. Pro optimalizaci a validaci této metody bylo nutné získat standard sibiromycinu, který nebyl komerčně dostupný. Již dříve popsané postupy LLE extrakce nebyly dle testování dostatečně účinné, tudíž byl vyvinut nový postup, díky němuž se podařilo získat dostatečné množství standardu sibiromycinu (97,0 %) pro účely optimalizace a validace UHPLC metody.

Dále byly studovány odlišnosti vyvinutých extrakčních metod – LLE a SPE. SPE technika se vyznačuje řadou výhod. Mezi její přednosti patří výtěžnost, reprodukovatelnost, rychlost a jednoduchost provedení a nižší spotřeba rozpouštědel. Při zvýhodňování SPE metody nelze opomenout fakt, že při tomto typu procesu nepřicházíme o důležité deriváty sibiromycinu, které ve své struktuře mají navíc cukernou složku, což se děje u LLE.

Validovaná metoda stanovení sibiromycinu byla využita k souhrnné studii produkce sibiromycinu na různých fermentačních médiích. V závislosti na typu média byly pozorovány změny množství sibiromycinu, compound 1 a compound 2. Následně byly na UHPLC isolovány píky mající podobná UV/VIS spektra jako sibiromycin a tyto látky byly identifikovány MS analýzou. Vyhodnocením MS spekter byl identifikován sibiromycin (m/z 476,2) a předpokládané struktury jeho derivátů. Jedná se o deriváty obsahující ve struktuře navíc cukernou složku a dále analog sibiromycinu (DH-sibiromycin) lišící se pouze přítomností dvojné vazby ve své molekule (m/z 474,2). Vzhledem k nedostatku materiálu nebyly tyto látky charakterizovány NMR analýzou.

Potvrzením existence obou typů látek - sibiromycinu a DH-sibiromycinu - byl objasněn výše zmiňovaný spor o chemickou strukturu sibiromycinu.

4 Literatura

1. Ilyushina, N. G.; Goldberg, L. E.: Pharmacological studies on sibiromycin, Antibiotiki 15, 612-617 (1970)
2. Leber, J. D.; Hoover, J. R. E.; Holden, K. G.; Johnson, R. K.; Hecht, S. M.: A revised structure for sibiromycin, Journal of the American Chemical Society 110, 2992-2993 (1988)
3. Gause, G. F.; Preobrazhenskaia, T. P.; Ivanitskaia, L. P.; Sveshnikova, M. A.: Production of the antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum* sp. nov. culture, Antibiotiki 14, 963-969 (1969)
4. Ward-Rainey, N.; Rainey, F. A.; Stackebrandt, E.: The phylogenetic structure of the genus *Streptosporangium*, Systematic and applied microbiology 19, 50-55 (1996)
5. Hurley, L. H.: Pyrrolo(1,4)benzodiazepine antitumor antibiotics. Comparative aspects of anthramycin, tomaymycin and sibiromycin, The Journal of Antibiotics 30, 349-370 (1977)
6. Puvvada, M. S.; Forrow, S. A.; Hartley, J. A.; Stephenson, P.; Gibson, I.; Jenkins, T. C.; Thurston, D. E.: Inhibition of bacteriophage T7 RNA polymerase *in vitro* transcription by DNA-binding pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines, Biochemistry 36, 2478-2484 (1997)
7. Hurley, L. H.; Lasswell, W. L.; Malhotra, R. K.; Das, N. V.: Pyrrolo-1,4-benzo-diazepines antibiotics. Biosynthesis of the antitumor antibiotic sibiromycin by *Streptosporangium sibiricum*, Biochemistry 18, 4225-4229 (1979)
8. Hurley, L. H.; Gairola, Ch.: Pyrrolo-1,4-benzodiazepine antitumor antibiotics: Biosynthetic studies on the conversion of tryptophan to the anthranilic acid moieties of sibiromycin and tomaymycin, Antimicrobial Agents and Chemotherapy 15, 42-45 (1979)
9. Hurley, L. H.: Elucidation and formulation of novel biosynthetic pathways leading to the pyrrolo-1,4-benzodiazepine antibiotics anthramycin, tomaymycin and sibiromycin, Accounts of Chemical Research 13, 263-269 (1980)
10. Li, W.; Khular, A.; Chou, S.; Sacramo, A.;Gerratana, B.: Biosynthesis of sibiromycin, a potent antitumor antibiotic, Applied and Environmental Microbiology 75, 2869-2878 (2009)
11. Brazhnikova, M. G.; Konstantinova, N. V.; Mesentsev, A. S.: Sibiromycin: Isolation and characterization, The Journal of Antibiotics 25, 668-673 (1972)

12. CDER/CBER, Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Biologics Evaluation and Research (2001)

5 Příloha

Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 83–91

Determination of sibiromycin and its natural derivatives using new analytical and structural approaches

Miroslav Šulc, Iva Fadrhoncová, Markéta Jelínková, Miriam Chudomelová, Jurgen Felsberg, Jana Olšovská