

HPLC법에 의한 2,4-디니트로플루오로벤젠을 유도체화제로 한 *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31218 변이균의 배양액 중 네브라마이신 펩터 2,4,5,5',6, 가나마이신 A 분석

박영근[#] · 박명용 · 김승철 · 양호길
유한양행 중앙연구소
(Received January 14, 1993)

Determination of Nebramycin Factor 2,4,5,5',6 and Kanamycin A in Fermentation Broth of *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31218 Mutant Using 2,4-Dinitrofluorobenzene(DNFB) as a Derivatizing Agent by High Performance Liquid Chromatography

Young-Keun Park[#], Myung-Yong Park, Seung-Chul Kim and Ho-Gil Yang
Yuhan Research Center, Kyonggi-Do 435-030, Korea

Abstract—A procedure for the high-performance liquid chromatographic determination of Nebramycin factors in fermentation broth of *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31218 mutant was investigated using pre-column derivatization and UV detection. The method is based on pre-column derivatization of Nebramycin factors with 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB) in the presence of Tris (hydroxymethyl)aminoethane. The chromatographic separation of derivatives of Nebramycin factors and unknown impurities is achieved using reversed-phase column (NOVA-PAK C₁₈, Waters Co.) and AcCN : H₂O : AcOH (53.0 : 46.5 : 0.5) as a mobile phase. The mixture of these derivatives were separated within 35 minutes and the optimum wavelength (λ_{max}) of the UV detector was 353 nm. The linearity of response for derivatives of Nebramycin factors is demonstrated for concentrations up to 500 μ g/ml and the relative standard deviation is less than 0.79%. Detection limit was 1.67 ng for the 10 μ l sample volume employed.

Keywords □ HPLC, Fermentation broth, Nebramycin factor, DNFB derivation, Reversed-phase C₁₈ column, UV detection.

Streptomyces tenebrarius,^{1,2)} *Streptoalloteichus hindustanus*^{3,4)} 등의 발효에 의해 생산되는 Nebramycin복합체는 동물용 항생제로 쓰이는 factor 2(Apramycin), 가수분해에 의해 factor 5(Kanamycin B), factor 6(Tobramycin)로 전환되는 factor 4, factor 5' 등 13가지의 다양한 factor들로 구성되어 있다.⁵⁻⁷⁾ 특히 fa-

ctor 6인 Tobramycin은 그람 음성균 및 다른 aminoglycoside계 항생물질에 대하여 저항력을 가지는 녹농균(pseudomonas)에 대하여 효과가 높아 패혈증, 중추신경계 감염증, 요로 감염증, 위장간 점막증 등의 치료에 이용되고 있는 중요한 약물이다.^{8,9)}

지금까지의 Nebramycin factor들의 분석법은 주사제, 안연고 등의 단일제제 또는 혈액이나 뇨 중에 있는 Tobramycin 등을 미생물분석법,¹⁰⁾ 이온크로마토그래

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

피법,¹¹⁾ HPLC법¹²⁻²⁴⁾을 이용하여 분석하였다. 그러나 미생물분석법은 분석하고자 하는 factor 이외에 다른 factor들이 공존할 경우 오차가 심한 단점이 있고, 최근에 개발된 이온크로마토그래피법은 음이온 교환 수지와 전기화학적 검출기를 이용하여, 역상 칼럼과 UV 검출기로 분리정량하기 힘든 factor 5'와 factor 6를 분리정량할 수 있으나, 배양액 시료에서의 분리능과 재현성이 떨어지는 단점이 있다. 또한 HPLC법은 UV흡수가 없는 aminoglycoside계 항생물질들을 유도체화하여 UV검출기나 형광검출기를 이용하여 검출했으나 아직까지 배양액에 공존하는 Nebramycin의 각 factor들을 분리정량하는 방법이 확립되어 있지 않다. Nebramycin factor들의 동시정량은 균주의 배양과정이나 정제과정에서 각 factor들의 변화를 관찰하는데 매우 중요하다.

이에 저자 등은 배양과정에서 나오는 배양액에 공존하는 Nebramycin factor들을 동시 정량하기 위해 DNFB유도체화 시약을 사용하여 UV흡수가 없는 각 Nebramycin factor들을 유도체화 시키고, 생성된 유도체들의 UV특성과 유도체화 조건, 분리정량 조건 등에 관하여 고찰하였다.

실험방법

실험기기—HPLC는 Waters사 제품으로 펌프는 M 510 pump, 검출기는 M481 Lambda-Max LC spectrophotometer를 사용하였고, 적분기는 HITACHI D-2000 chromato-integrator, diode array detection은 Varian사의 Model 9010 solvent delivery system과 9065 polychrometer를 사용하였다.

시약 및 시료—Tobramycin, Kanamycin A, Kanamycin B 표준품은 Sigma, Apramycin 표준품은 Eli Lilly사에서 구입하여 사용하였고, Nebramycin factor 4, factor 5' 정제품과 실험에 사용한 배양액은 본 연구소에서 제조하여 사용하였다. 유도체화 반응에 사용한 2,4-dinitrofluorobenzene(DNFB)는 Pierce사, Tris(hydroxymethyl)aminoethane은 Wako사에서 구입하였고, 기타 시약은 특급 및 1급시약들을 사용하였다. 실험에 사용한 용매(AcCN, MeOH, AcOH 등)는 모두 HPLC급을 사용하였으며, 증류수는 18 M-ohm 탈이온수를 사용하였고, 모든 용매는 Millipore여과기(0.45 µm filter)로 여과하여 사용하였다.

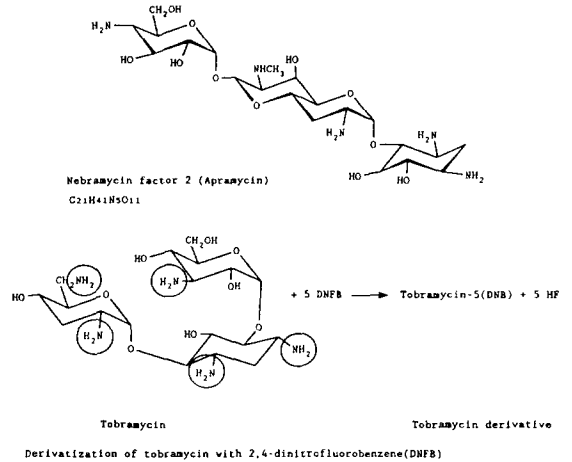
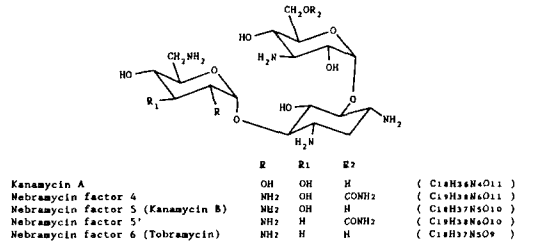


Fig. 1—Structure of Nebramycin factors and reaction process.

시료용액 조제—표준품 혼합용액은 Tobramycin, Kanamycin A, Kanamycin B, Apramycin 표준품을 증류수에 녹여 사용하였다(0~500 ppm). non-conversion 배양액은 원액에 NaOH를 가해 0.3 N NaOH용액으로 만든 다음 희석하여 사용하였으며, conversion배양액은 non-conversion배양액의 일부를 취하여 98°C oil bath에서 6시간 동안 가열하여 가수분해시켜 factor 4와 factor 5'를 factor 5와 factor 6로 전환시킨 다음 사용하였다.

유도체화 과정—표준품 혼합용액과 배양액(conversion, non-conversion)을 각각 reaction vial(5 ml vol.)에 250 µl씩 넣고, 1 M Tris용액 250 µl와 4%(w/v) DNFB/AcCN용액 1000 µl를 첨가한 후 마개를 밀봉하고 교반한 다음, 60°C heating block에서 40분간 반응시켜 표준액과 배양액에 공존하고 있는 각 Nebramycin factor들의 amino group을 dinitrophenyl 유도체화 시켰다(Fig. 1).¹⁷⁾ 이 반응액을 실온으로 방냉 후 4°C에서 30분 동안 방치하여 층을 분리시킨 다음 AcCN층(상층) 10 µl를 컬럼에 주입하였다. 이 때 반

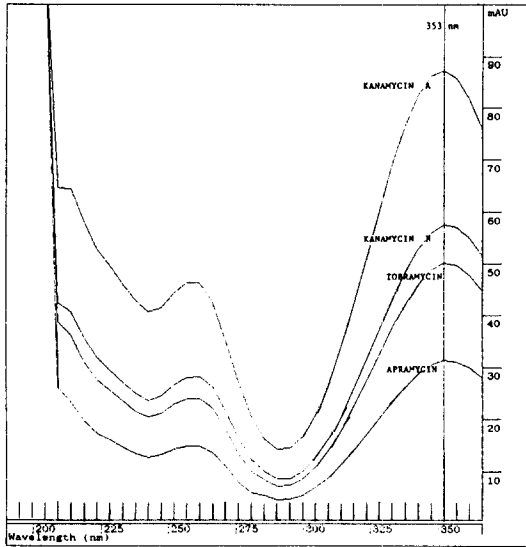


Fig. 2—UV spectra of the derivatized mixture separated by HPLC.

용액과 DNFB, Tris용액의 농도, 반응시간, 온도 등을 변화시키면서 아래의 HPLC 조건에 따라 실험하였다.

HPLC Condition

Column	: NOVA-PAK C_{18} (3.9 mm i.d \times 150 mm, 4 μ m, Waters Co.)
Detection wavelength	: 353 nm
Sensitivity	: 0.1 AUFS
Mobile phase	: AcCN : H ₂ O : AcOH (53.0 : 46.5 : 0.5)
Flow rate	: 1.5 ml/min
Injection amount	: 10 μ l
Temperature	: Ambient Temp.

실험결과 및 고찰

Nebramycin factor들의 dinitrophenyl 유도체의 검출과장 검토—각각의 농도가 100 ppm인 표준품 혼합용액을 DNFB와 반응시켜 dinitrophenyl 유도체를 형성시킨 다음, 196~367 nm의 범위에서 diode array detector를 이용한 분석결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 factor들의 dinitrophenyl 유도체는 353 nm에서 최대흡수 과장을 나타내었으므로 검출과장을 353 nm로 고정시켜 모든 실험을 수행하였다.

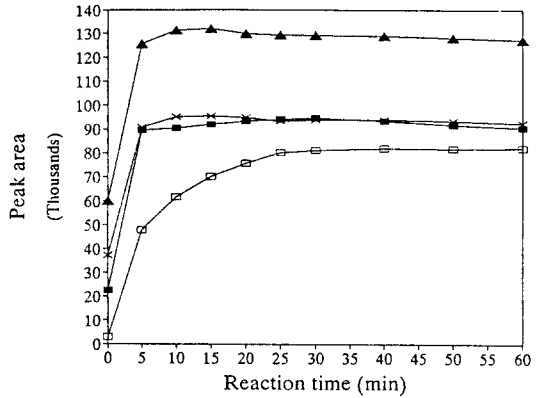


Fig. 3—Effect of the reaction time.

—×—: Kanamycin A, —■—: Kanamycin B,
—▲—: Tobramycin, —□—: Apramycin.

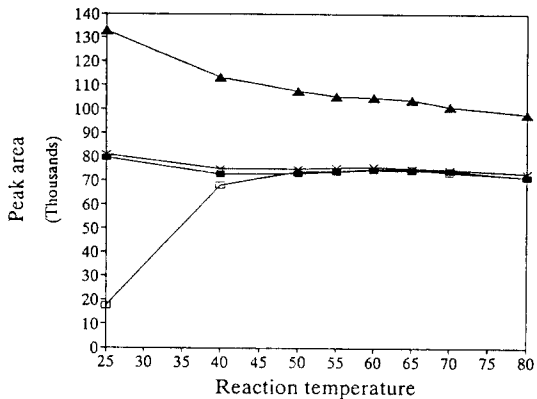


Fig. 4—Effect of the reaction temperature.

—×—: Kanamycin A, —■—: Kanamycin B,
—▲—: Tobramycin, —□—: Apramycin.

반응용매 조건—표준품 혼합용액(각 100 ppm)을 Table I과 같이 반응용매들을 변화시키면서 상기의 유도체화 과정에 따라 각각의 반응성을 검토해 본 결과 Tris용액 하에서 DNFB/AcCN용액이 반응성이 가장 좋게 나타났다. 이 때 4°C에서 30분 동안 방치하면 AcCN층(상층)과 H₂O층(하층)으로 층분리가 생기는데 AcCN층에 반응생성물이 존재하였으며, 배양액을 반응시킨 결과 단백질 등은 수층으로 완전히 침전되었다.

반응온도 및 반응시간의 영향—표준품 혼합용액(각 100 ppm)을 가지고 DNFB와 각 Nebramycin factor들의 유도체화반응에 미치는 반응시간을 60°C에서 5

Table I—Effect of the reaction solution

(peak area)

Base solution	4% DNFB/ solution	Kanamycin A	Apramycin (factor 2)	Kanamycin B (factor 5)	Tobramycin (factor 6)	cf.
pH 10.5 0.5 M Tris-H ₂ O	MeOH	7287	1164	*	552	S
	EtOH	35061	3738	*	2156	S
	Et ₂ CO	101041	106397	105776	117892	C
pH 10.5 NaOH	AcCN	125949	124577	129171	143832	C
	MeOH	9445	*	*	3822	S
	EtOH	23475	26300	17191	1762	S
KOH	Et ₂ CO	78578	10414	93150	88770	C
	AcCN	68752	17147	60192	95253	C
	MeOH	6601	*	*	2869	S
pH 10.5 0.1 M NH ₄ Cl-NH ₄ OH buffer	EtOH	19810	1916	43718	*	S
	Et ₂ CO	68545	9483	63940	82878	C, T
	AcCN	53694	10260	50575	90676	C
pH 10.5 0.1 M NH ₄ Cl-NH ₄ OH buffer	MeOH	11889	3228	14300	33518	S
	EtOH	35125	21045	32222	80076	S
	Et ₂ CO	104596	30228	103704	114682	C
pH 9.3 Borax	AcCN	108751	27401	116921	148687	C
	MeOH	4686	549	*	715	S
	EtOH	34004	9471	*	470	S
pH 9.3 Borax	Et ₂ CO	489	11383	*	5134	S
	AcCN	373	24367	*	532	S

cf. S : sedimented, C : clear, T : tailing effect.

*Not estimated.

분 간격으로 0~60분까지 변화시키면서 실험한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 30분 이상에서는 반응이 거의 일정하게 진행되었으므로, 반응시간을 40분으로 고정시켰으며, 반응온도를 25~80°C의 범위에서 5~10°C 간격으로 변화시켜 반응시킨 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 50°C 이상에서는 반응이 거의 일정한 경향을 보였고, 배양액에서도 동일한 결과를 나타내었으므로 반응온도(60°C)와 시간(40분)을 고정시키고 실험을 수행하였다.

DNFB와 Tris용액의 농도변화에 따른 영향—표준품 혼합용액(각 100 ppm)을 가지고 Tris용액의 농도를 1 M로 일정하게 하고 DNFB/AcCN용액의 농도를 0~10%로 변화시켜 가면서 60°C에서 40분간 반응시켜 실험한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 DNFB는 4% 농도에서 반응성이 가장 좋게 나타났으며, 4% DNFB/AcCN용액 하에서 Tris용액은 Fig. 6에서와 같이 0.4 M 이상의 농도에서 일정한 결과를 보였다. 이때 시료용액과 Tris용액, DNFB/AcCN용액을 1 : 1 : 4의 비율로 혼합하여 반응시켰을 때, 반응액의 AcCN

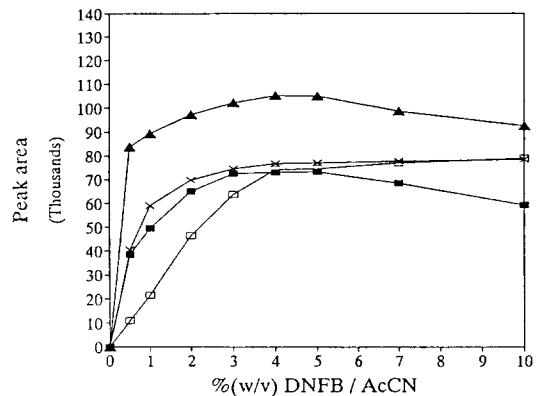


Fig. 5—Effect of concentration of the DNFB/AcCN solution.

—×—: Kanamycin A, —■—: Kanamycin B,
—▲—: Tobramycin, —□—: Apramycin.

총과 H₂O층이 4 : 2의 비율로 두 층이 선명하게 분리되었다.

검량선 작성 및 회수율, 재현성 검토—표준품 혼

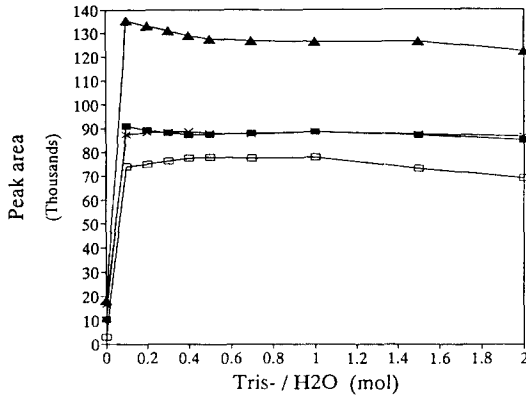


Fig. 6—Effect of moles of the Tris-solution.
 —×—: Kanamycin A, —■—: Kanamycin B,
 —▲—: Tobramycin, —□—: Apramycin.

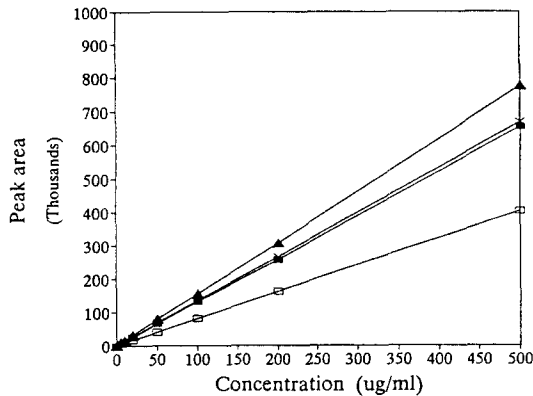


Fig. 7—Calibration curves obtained by the mixture of Nebramycin factor.
 —×—: Kanamycin A, —■—: Kanamycin B,
 —▲—: Tobramycin, —□—: Apramycin.
 Kanamycin A $Y=1339.71X-104.65$ $R=0.99997$
 Kanamycin B $Y=1310.86X-852.76$ $R=0.99993$
 Tobramycin $Y=1554.12X-397.19$ $R=0.99997$
 Apramycin $Y=805.90X-107.84$ $R=0.99999$

합용액의 각 물질들의 농도를 0~500 ppm 범위에서 변화시켜 정량성을 검토해본 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 $R=0.9999$ 이상의 양호한 결과를 얻었고, non-conversion 배양액과 conversion 배양액에 첨가한 각 Nebramycin factor들의 회수율과 재현성을 8회 반복 측정해 본 결과 Table II에 나타난 바와 같이 99~102%의 회수율을 보였으며 상대표준편차(RSD)

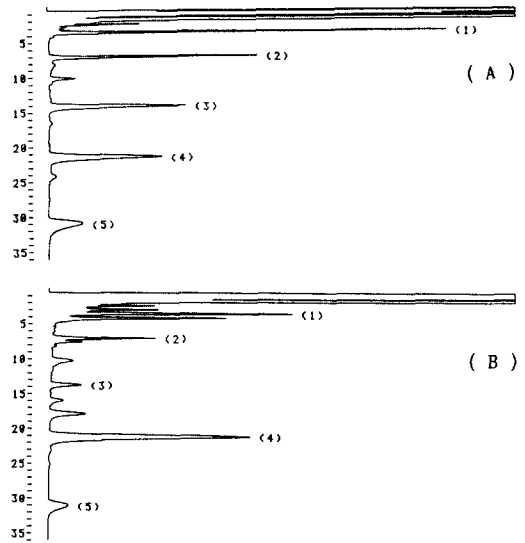


Fig. 8—Typical chromatogram of the derivatized Nebramycin factors.
 (A) Standard solution (50 ppm)
 (B) Non-conversion fermentation broth, 20X.
 (A): Kanamycin A (1), Tris-DNFB complex (2),
 Kanamycin B (3), Tobramycin (4), Apramycin (5)
 (B): Kanamycin A (1), Tris-DNFB complex (2),
 factor 4 (3), factor 5' (4), Apramycin (5)
 t_R (min): (1) 3.65, (2) 7.17, (3) 14.02, (4) 21.44,
 (5) 31.05

는 0.8% 이하의 양호한 실험결과를 얻었다. 또한 non-conversion 배양액과 conversion 배양액을 비교해 보았을 때의 크로마토그램에서 factor 5와 그것의 전구물질인 factor 4, 그리고 factor 6과 그것의 전구물질인 factor 5'은 같은 t_R (min)을 나타냈고, 동일한 감도로 검출되어 factor 4와 factor 5'을 factor 5와 factor 6 표준품을 이용해 분석해도 factor 4와 factor 5' 정제품을 사용해서 분석했을 때와 같은 결과를 얻을수 있었다. 즉 factor 4가 5로 factor 5'이 factor 6로의 전환되는 반응이 1:1의 비율로 진행됨을 알 수 있었다.

배양액중의 각 Nebramycin factor 분석검토—유도체화시킨 표준품 혼합용액(50 ppm)과 non-conversion 배양액을 역상칼럼(NOVA-PAK C_{18})과 $AcCN:H_2O:AcOH(53.0:46.5:0.5)$ 의 이동상을 사용하여 UV 353 nm에서 측정된 결과 Fig. 8에서 보는 바와

Table II—Recovery of Nebramycin factors from fermentation broth

(a) Conversion fermentation broth				ppm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Sample	Kanamycin A	Apramycin	Kanamycin B (factor 5)	Tobramycin (factor 6)
1	65.99	69.59	58.71	117.18
2	66.21	68.89	58.99	116.61
3	66.15	68.36	58.57	116.64
4	66.13	68.36	58.69	117.31
5	65.96	69.08	58.31	116.40
6	65.73	68.04	59.36	117.06
7	66.21	68.60	58.88	116.66
8	66.15	69.43	58.37	117.17
Average	66.07	68.79	58.73	116.88
\pm SD	0.16	0.55	0.34	0.34
RSD (%)	0.25	0.79	0.58	0.29
Blank	12.01	16.53	8.19	65.43
Added amount	53.90	51.80	50.70	51.30
Recovery (%)	100.29	100.89	99.69	100.28

(b) Non-Conversion fermentation broth				ppm ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Sample	Kanamycin A	Apramycin	factor 4	factor 5'
1	66.73	68.37	58.81	116.56
2	66.15	68.36	59.19	116.63
3	65.66	68.15	59.49	116.45
4	65.66	68.76	58.54	117.07
5	65.89	68.05	59.03	116.99
6	65.81	68.01	58.19	116.57
7	65.60	68.75	58.69	116.91
8	65.76	68.60	59.26	116.70
Average	65.91	68.38	58.90	116.74
\pm SD	0.38	0.30	0.43	0.23
RSD (%)	0.57	0.44	0.72	0.20
Blank	11.90	16.68	7.97	64.63
Added amount	53.90	51.80	50.70	51.30
Recovery (%)	100.21	99.81	100.46	101.57

SD : Standard deviation.

RSD : Relative standard deviation.

같이 각 factor들을 35분 이내에 완전히 분리정량할 수 있었다.

결 론

비전환(non-conversion) 배양액중의 Nebramycin factor 2, 4, 5'과 Kanamycin A, 그리고 전환(conversion) 배양액중의 factor 2, 5, 6과 Kanamycin A는 1 M

Tris용액하에서 4%(w/v) DNFB/AcCN용액으로 60°C에서 40분간 유도체화반응을 시켜 역상컬럼(NOVA-PAK C₁₈ 컬럼)과 AcCN : H₂O : AcOH(53.0 : 46.5 : 0.5)의 이동상을 이용하여 UV 353 nm에서 동시정량을 할 수 있었다. 배양액 중에 factor 4와 factor 5, 그리고 factor 5'과 factor 6가 공존할 경우에는 이 방법으로는 분리가 불가능하지만 비전환 배양액에는 factor 5, factor 6가 존재하지 않으며 전환과정을 거쳤을 때 1 : 1

의 비율로 전환되므로 factor 5와 factor 6 표준물로 그들의 전구물질인 factor 4와 factor 5'을 정량할 수 있음을 알았다.

이상의 방법으로 DNFB 유도체화제를 사용하여 *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31218 변이균의 배양액에 공존하는 각 Nebramycin factor들을 유도체화 시켜 HPLC법으로 간편하게 동시정량할 수 있었으며, 다른 균주들의 배양액이나 혈청, 뇨, 그리고 의약품 등에 공존하는 Kanamycin A, Apramycin(factor 2), Kanamycin B(factor 5), Tobramycin(factor 6)의 동시정량에도 널리 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Stark, W. M., Hoehn, M. M. and Knox, N. G.: Nebramycin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex I. Detection and Biosynthesis. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 314 (1967).
- 2) Higgins, C. E. and Kastner, R. E.: Nebramycin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex II. Description of *Streptomyces tenebrarius*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 324 (1967).
- 3) Tomita Koji, Uenoyama Yumiko, Numata Kei-ichi, Sasahira Takashi, Hoshino Yutaka, Tsukiura Kei-ichi and Kawaguchi Hiroshi: *Streptoalloteichus*, a new genus of the family actinoplacae. *J. Antibiot.*, 31(6), 497 (1978).
- 4) Williams, S. T., M. Elisabeth Sharpe and John G. Holt: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Volume 4, Williams & Wilkins, Baltimore, Hong Kong, London, Sydney, p. 2569 (1989).
- 5) Koch, K. F. and Rhoades, J. A.: Structure of Nebramycin factor 6, a new aminoglycosidic antibiotic. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 309 (1970).
- 6) Koch, K. F., Merkel, K. E., Connor, S. C. O', Occolowitz, J. L., Jonathan W. Paschal and Dorman, D. E.: Structure of some of the minor aminoglycoside factors of the Nebramycin fermentation. *J. Org. Chem.*, 43(7), 1430 (1978).
- 7) Koch, K. F., Daris, F. A. and Rhoades, J. A.: Nebramycin : Seperation of the complex and identification of factors 4,5' and 5. *J. Antibiot.*, 26(12), 745 (1973).
- 8) James E. F. Reynols: *Martindale*, 29th ed. London the pharmaceutical press, p. 326 (1989).
- 9) Gerald, K. McEvoy: *Drug Information*TM, American Society of Hospital Pharmacists, INC., p. 1478 (1989).
- 10) Revision of Committe: *Sixth applement to USP XXII and to NF XVII*, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Washington, D. C., p. 2914 (1992).
- 11) Polta, J. A. and Johnson, D. C.: Liquid chromatographic seperation of aminoglycosides with pulsed amerometric detection. *J. Chromatogr.*, 324, 407 (1985).
- 12) Mays David, Apeldoorn Richard J. Van and Lauback Ronald G.: High-Performance Liquid Chromatographic determination of Kanamycin. *J. Chromatogr.*, 120, 93 (1976).
- 13) Tsuji Kiyoshi, Goetz John F, Meter William Van and Gusciora Kathy A.: Normal-phase High-Performance Liquid Chromatographic determination of Neomycin sulfate derivatized with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *J. Chromatogr.*, 175, 141 (1979).
- 14) Barends Dirk M., Sandt Johannes S. F. Van and Hulshoff Abram: Micro determination of Gentamicin in serum by High-Performance Liquid Chromatography with UV detection. *J. Chromatogr.*, 182, 201 (1980).
- 15) Elrod Jr. Lee, White Landy B. and Wong Chun F.: Determination of Fortimicin A sulfate by High-Performance Liquid Chromatography after derivatization with 2,4-dinitrofluorobenzene. *J. Chromatogr.*, 208, 357 (1981).
- 16) Barends Dirk M., Zwaan Cornelis L. and Hulshoff Abram: Improved microdetermination of gentamicin and sisomicin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, 222, 316 (1981).
- 17) Dirk M. Barends, Cornelis L. Zwaan and Abram Hulshoff: Micro-determination of Tobramycin in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr.*, 225, 417 (1981).
- 18) Kubo Hiroaki and Kinoshita Toshio; Micro deter-

- mination of gentamicin in serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **227**, 244 (1982).
- 19) D'Souza, J. and Ogilvie, R. I.: Determination of gentamicin components C_{1a}, C₂ and C₁ in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **232**, 212 (1982).
- 20) Klein, H. and Teichmann, R.: Isotachoretic assay of aminoglycosides and lincomycins in pharmaceuticals. *J. Chromatogr.*, **250**, 152 (1982).
- 21) Inchauspe, G. and Samain, D.: Use of perfluorinated carboxylic acids in the separation of aminoglycoside antibiotics by ion-pair reverse-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **303**, 227 (1984).
- 22) Barends, D. M., Blauw, J. S., Mijnsbergen, C. W., Govers, C. J. L. R. and Hulshoff, A.: Pre-column derivatization of aminoglycosides with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *J. Chromatogr.*, **322**, 321 (1985).
- 23) Gambardella, P., Punziano, R., Gionti, M., Guadalupe, C., Mancini, G. and Mangia, A.: Quantitative determination and separation of analogues of aminoglycoside antibiotics by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **348**, 229 (1985).
- 24) Caturla, M. C. and Cusido, E.: High-performance liquid chromatography method for the determination of aminoglycosides based on automated pre-column derivatization with o-phthalaldehyde. *J. Chromatogr.*, **593**, 69 (1992).