



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0003408
(43) 공개일자 2010년01월11일

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01) G01N 30/00 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0063284

(22) 출원일자 2008년07월01일

심사청구일자 2008년07월01일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

김창준

경상남도 진주시 평거동 들말대경아파트 104동 103호

서양곤

경상남도 진주시 평거동 401 동신2아파트 102동 101호

이학

경상남도 진주시 가좌동 900번지 경상대학교 생명 화학공학과

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

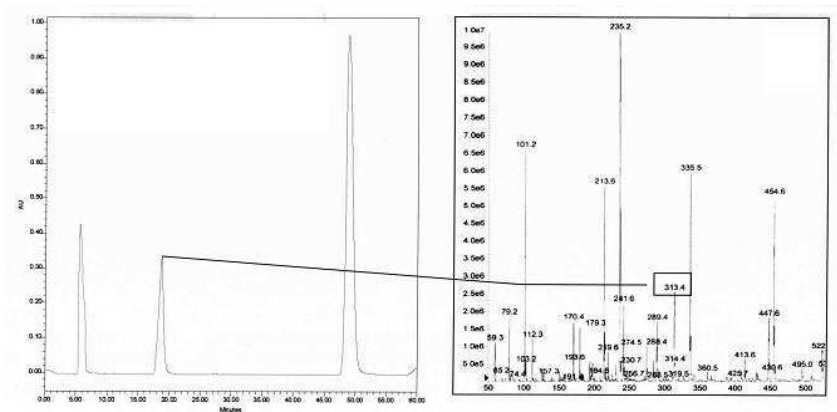
(54) 발리올아민의 UV 분석방법

(57) 요약

본 발명은 발리올아민의 UV 분석 방법에 관한 것으로, 본 발명의 구성은 발리올아민을 페닐이소시아네이트로 유도체화시켜 검출 민감도를 증진시킴으로써 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)/ UV 검출기로 분석하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따르면, 발리올아민의 검출 민감도를 극대화시켜 신속하고 정확한 HPLC 분석, 나아가 UV 분석을 가능케할 수 있다.

대표도 - 도1b



특허청구의 범위

청구항 1

발리올아민을 미생물 (microbial) 배양배지내에서 발색단 시약으로 유도체화하여 검출 민감도를 증진시키는 단계; 및

검출 민감도가 증진된 발리올아민을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)/ UV 검출기로 분석하는 단계를 포함하여 이루어지는 발리올아민의 UV 분석방법

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 microbial(미생물) 배양배지는

- 1) 글루코오스 50 g/L, soybean flour 36 g/L, 펩톤 5 g/L, CaCO₃ 4 g/L;
- 2) 글루코오스 20 g/L, 옥수수 전분 40 g/L, 콘 스텝 리퀴(corn steep liquor) 20 g/L, 옥수수 글루텐 가루(corn gluten meal) 40 g/L, NH₄Cl 5 g/L, NaCl 15 g/L, CaCO₃ 15 g/L; 또는
- 3) 글루코오스 10 g/L, 가용성 녹말 50 g/L, 펩톤 15 g/L, 옥수수 글루텐 가루 30 g/L, NaCl 5 g/L, CaCO₃ 10 g/L;로부터 선택된 1종을 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 발색단 시약으로는 페닐이소시아네이트, 1-나프틸 이소티오시아네이트 또는 페닐이소티오시아네이트로부터 선택하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 발색단 시약은 페닐이소시아네이트와 트리에틸아민을 함유한 디메틸 술폭사이드(DMSO) 용액의 형태로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 디메틸 술폭사이드(DMSO) 용액은 페닐이소시아네이트 2.5mM - 67.2mM 및 트리에틸아민 0.5-15 g/L을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 디메틸 술폭사이드(DMSO) 용액은 페닐이소시아네이트 50.4 mM 및 트리에틸아민 2.25g/L을 함유하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 발색단 시약은 1mM 발리올아민 대비 2.5mM - 67.2mM 범위내로 사용하는 것을 특징으로 하는 방법

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 발색단 시약으로의 유도체화 조건은 30℃에서 15-30분 범위내인 것을 특징으로 하는 방법

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 발리올아민의 UV 분석방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 발리올아민을 페닐이소시아네이트로 유도체화시켜 검출 민감도를 증진시킴으로써 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)/UV 검출기로 분석하는 방법에

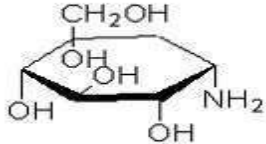
관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 발리올아민은 당뇨병 치료약제인 voglibose를 validamycin A로부터 합성하는데 중요한 화학 중간체이고, 또한 *Streptomyces hygroscopicus subsp.*의 배양액으로부터 분리된다.

<3> 참고로, 발리올아민의 화학식은 다음과 같다.

화학식 1



<4>

<5>

<6> 현재, 대사공학 기술을 사용하여 *Streptomyces* 세포의 배양에 의해 발리올아민을 생산하려는데 집약적인 노력이 수행되고 있다. 따라서, 발리올아민의 정량 분석은 voglibose 생산 공정의 정량 제어 또는 최적화 혹은 향후 발리올아민을 생산하는 재조합 미생물 배양공정을 모니터링하는 데 극히 중요하다 할 것이다. 현재 발리올아민 분석을 위하여 박막크로마토 그래피법 (TLC)을 사용하고 있지만 이는 정량적인 결과를 제시하지 못한다.

<7>

한편 빠르고 정확하게 정량 분석할 수 있는 방법이 HPLC 법인데, 이의 개발에 있어서 가장먼저 해결해야 할 부분은 칼럼으로부터 분리되어 나온 발리올아민 검출의 민감도를 증진시키는 것이다. 상기 발리올아민은 현저한 UV 흡수능 혹은 형광능을 갖는 기능기를 갖고 있지 않아 UV 혹은 형광 검출기로 검출이 불가능하다. 그러나 발리올아민 분자에 아민(-NH₂)기를 갖고 있어 chromophoric reagent (발색단 시약)을 아민기와 반응시켜 유도체화시켜 발리올아민 검출의 민감도를 증진시키는 것이 가능하다. 아민기를 갖는 아미노산, 아미노글리코사이드(aminoglycoside) 항생제의 검출을 위하여 통상 사용되어지는 유도체화 제제로는 2,4-디니트로플루오로벤젠 (DNFB), *o*-프탈알데히드 (OPA), 2,4,6-트리니트로벤젠 술폰산 (TNBS) 혹은 dansyl chloride 등을 들 수 있다. *o*-프탈알데히드 (OPA) 혹은 dansyl chloride 유도체는 형광검출기를 이용하여 검출하고 2,4-디니트로플루오로벤젠 (DNFB) 혹은 2,4,6-트리니트로벤젠 술폰산 (TNBS)의 유도체는 UV 검출기를 이용하여 검출되는데, 이와 같은 제제들을 이용한 반응은 부반응이 많고 생성된 유도체들도 안정(stable)하지 않아 재현성이 떨어지는 문제점들이 지적되어 왔다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8>

이에 본 발명자들은 발리올아민의 검출에 대한 민감도를 개선시키는 방안에 대하여 연구를 계속하던 중 발리올아민을 미생물(microbial) 배양 배지내에서 페닐이소시아네이트(PIC)로 미리 유도체화하면 신속하면서도 정확한 HPLC 방법을 적용할 수 있어 UV 검출이 가능하다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<9>

즉, 본 발명의 목적은 발리올아민을 특정 발색단 시약(chromophoric reagent)으로서 페닐이소시아네이트를 사용하여 검출 민감도를 개선시켜 UV 검출을 가능케하는 방법을 제공하려는데 있다.

과제 해결수단

<10>

본 발명에 의하면,

<11>

발리올아민을 미생물(microbial) 배양배지내에서 발색단 시약으로 유도체화하여 검출 민감도를 증진시키는 단계; 및

<12>

검출 민감도가 증진된 발리올아민을 HPLC/UV 검출기로 분석하는 단계; 를 포함하여 이루어지는 발리올아민의 UV 분석방법을 제공한다.

<13> 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

<14> 본 발명에서 사용하는 미생물 배양배지로는 다음 중에서 선택할 수 있다.

<15> 1) 글루코오스 50 g/L, soybean flour 36 g/L, 펩톤 5 g/L, CaCO_3 4 g/L;

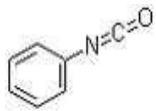
<16> 2) 글루코오스 20 g/L, 옥수수 전분 40 g/L, 콘 스틱 리퀴(corn steep liquor) 20 g/L, 옥수수 글루텐 가루(corn gluten meal) 40 g/L, NH_4Cl 5 g/L, NaCl 15 g/L, CaCO_3 15 g/L;

<17> 3) 글루코오스 10 g/L, 가용성 녹말 50 g/L, 펩톤 15 g/L, 옥수수 글루텐 가루 30 g/L, NaCl 5 g/L, CaCO_3 10 g/L.

<18> 이중에서 하기 실시예에서도 규명된 바와 같이, 특히 1)의 조성을 갖는 배지를 사용하는 것이 효과적이다.

<19> 또한, 발리올아민의 검출 민감도를 개선시키기 위한 발색단 시약(chromophoric reagent)으로서 페닐 이소시아네이트, 1-나프틸 이소티오시아네이트, 또는 페닐이소티오시아네이트를 사용한다. 이중에서 상기 페닐 이소시아네이트의 화학식은 다음과 같다:

화학식 2



<20>

<21> 또한, 본 발명에서 발리올아민의 유도체화 반응이 일어나기 위해서는 발리올아민 대비 과량의 페닐 이소시아네이트가 필요하다. 뿐만 아니라 미생물 배양을 위한 배지 내에는 아미노산을 비롯한 아미노기를 포함하는 물질들이 존재하는 데, 이와 같은 물질들은 페닐이소시아네이트와 반응하여 발리올아민과 반응에 필요한 페닐이소시아네이트를 소모하게 된다. 이와 같은 모든 사항을 고려하여 반응에 필요한 적정량의 페닐이소시아네이트를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 페닐이소시아네이트는 하기 실시 예2에서도 규명된 바와 같이 2.5 mM 미만의 페닐이소시아네이트를 사용 시 발리올아민-PIC 유도체 생성량이 작아 UV 검출기로 검출하는 데 어려움이 있다. 한편 67.2 mM의 페닐이소시아네이트 사용 시 사용된 발리올아민 1mM이 모두 유도체화될 수 있으므로, 효율성 및 경제성 측면을 함께 고려하여 볼 때 1mM 발리올아민 대비 2.5mM - 67.2mM으로 사용하는 것을 일 특징으로 한다.

<22> 또한, 본 발명에서 상기 페닐이소시아네이트는 페닐이소시아네이트 및 트리에틸아민을 함유한 디메틸술폭사이드 용액의 형태로 사용되는 것을 특징으로 한다. 이는 염기적 조건에서 페닐이소시아네이트에 의한 발리올아민 유도체화가 촉진되기 때문으로, 상기 반응용액을 염기적 조건으로 유지시키기 위하여 트리에틸아민용액을 사용하는데 일 특징을 갖는 것이다. 이때 0.5 g/L 미만으로 트리에틸아민을 사용 시, 반응액은 유도체화에 충분한 염기조건이 되기 어렵고, 15 g/L를 초과하여 트리에틸아민을 사용할 경우 효과를 더 이상 극대화하기 어렵다. 따라서 0.5 g/L - 15 g/L 사이의 트리에틸아민을 사용하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 2.25g/L의 트리에틸아민을 사용하는 것이 최적의 효과를 발휘할 수 있어 보다 바람직하다.

<23> 즉, 상기 디메틸술폭사이드 용액은 이에 한정하는 것은 아니나, 상술한 바와 같이 페닐이소시아네이트 2.5mM - 67.2mM 및 트리에틸아민 0.5-15 g/L을 함유하는 것이 효과 측면에서 바람직하며, 페닐이소시아네이트 50.4 mM 및 트리에틸아민 2.25g/L을 함유하는 것이 최적의 효과를 발휘할 수 있어 보다 바람직하다.

<24>

<25> 나아가, 상기 페닐이소시아네이트로의 유도체화 조건은 이에 한정하는 것은 아니나 약 30℃에서 15-30 분간, 보다 바람직하게는 약 30℃에서 30분정도 수행하는 것이 민감도 및 validate를 증강시키는 측면을 감안할 때 좋다.

<26>

<27> 또한, 본 발명에서 상기 발리올아민 검출은 고성능 액체 크로마토그래피 방법을 사용하여 수행하는 것을 일 특징으로 한다.

<28> 상기한 페닐이소시아네이트로 사전 유도체화한 다음 전자분무이온화형 질량분석기(electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS)) 분석을 수행한 결과, 상기 반응도중 발리올아민-PIC 유도체가 형성된 것을 확인할 수 있었다.

<29> 한편, HPLC 분석에 따르면, 상기 유도체는 240 nm에서 검출된 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로는 하기 실시 예에서 규명된 바와 같이, 발리올아민이 포함되지 않은 blank 와 대비할 경우, 새로운 피크는 HPLC 분석에서 18.5min에서 관찰되었으며, 이는 MS 분석에서 유도체화된 발리올아민이 나타난 313.4 m/z와 합치되는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조)

<30> 또한, spike된 배양배지로부터 유도체화된 발리올아민의 피크 영역은 증류수에 용해된 표준 시료에서보다 2.2배 낮았다. 이는 배양 배지내 아미노 화합물의 존재로 인한 것으로 여겨진다. 따라서 이로부터 PIC 첨가의 효과를 검증할 수 있었다.

<31> 이뿐 아니라, PIC 50.4 mM 이상 첨가 시 spike 배양배지로부터 유도체화된 발리올아민의 최대 피크 영역을 관찰하였다.

<32> 또한, 발리올아민에 대한 출발 물질로서 발리엔아민이 존재하더라도 발리올아민의 HPLC 분석을 간섭하지 않음을 함께 확인할 수 있었다 (도 3 참조).

<33> 상술한 바와 같이, 본 발명에 따르면, UV 검출기로 HPLC를 사용하여 발리올아민을 분석하기에 적합한 것이다.

효 과

<34> 본 발명에 따르면, 발리올아민을 페닐이소시아네이트로 유도체화 시킴으로써 발리올아민의 검출 민감도를 극대화시켜 신속하고 정확한 HPLC 분석을 가능케할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<35> 화합물 및 반응시약:

<36> 발리올아민, 발리엔아민, 아세토니트릴(ACN), 페닐이소시아네이트 (PIC), 트리에틸아민(TEA), 디메틸술폰(DMSO), 증류수, 메탄올 및 기타 화합물 및 용매들을 분석학적 등급으로 준비하였다.

<37> 실시예 1: 표준용액에 포함된 발리올아민의 페닐이소시아네이트와의 유도체화 실험

<38> 본 실시예에서는 표준 발리올아민을 페닐이소시아네이트로 유도체화 가능성을 시험하였다.

<39> 1,000 mg/L의 발리올아민 저장용액 100 μ L를 증류수 400 μ L에 혼합하여 제조한 200mg/L의 발리올아민 표준용액 500 μ L를 20mL 유리 바이알 (glass vial)로 옮겨 이를 50°C 진공오븐에서 건조시켰다. DMSO 750 μ L를 첨가하여 건조된 시료를 완전히 용해시킨 후 15 g/L의 트리에틸아민 150 μ L와 503.7mM의 페닐이소시아네이트 100 μ L를 첨가하였다. 이 반응용액과 발리올아민이 포함되지 않은 반응용액 (blank)을 30°C에서 30분간 방치하였다.

<40> <유도체 확인>

<41> 상기 실시예 1에서 얻어진 유도체에 대하여 전자분무이온화형 질량분석기(ESI-MS, 모델명: 3200 Q trap)를 이용하여 양이온 형성모드로 질량분석을 실시하였다. Turbo VTM source와 Turboionspray 탐침자가 장착된 3200 Q trap LC/MS/MS 시스템 (Applied Biosystems사, 미국 캘리포니아주 포스터 시 소재)이 사용되었고, 기기의 제어와 데이터 처리를 위하여 각각 BioanalystTM (버전:1.4.2)과 Analyst software(버전:1.4.2)가 사용되었다. 질량분석을 수행함에 있어서 분무 및 건조 가스로 질소를 사용하였고, 두 경우 모두 유속은 2 mL/min이었다. capillary (모세관) 전압은 5.5 kw였고 source의 온도는 500°C였다.

<42> 이와 같은 질량분석을 통하여 상기 반응에 의하여 발리올아민-PIC 유도체가 형성된 것을 확인할 수 있었다. 또한, HPLC 분석을 수행하였다. 구체적인 HPLC 장치로는 펌프 (515 HPLC pump)와 UV검출기 (Waters 486)가 장착된 Waters사(미국 매사추세츠 주 밀포트에 위치)의 HPLC 시스템에 YMC (일본 교토에 위치)사의 J'sphereODS-H80 (지름: 4.6cm, 길이: 25cm) 칼럼을 장착한 후, 아세토니트릴(90%)과 0.5mM의 소듐옥틸설페이

트가 용해된 증류수 (10%)를 혼합한 이동상 용액을 분당 1mL로 공급하며 분석을 수행하였다. 유도체화된 시료 20 μ L를 주입하였고, 분리되어 나오는 피크는 240 nm에서 검출되었다.

<43> 한편, 발리올아민이 포함되지 않은 blank와 대비할 경우, 새로운 피크는 HPLC 분석에서 18.5min에서 관찰되었으며, 이는 질량 분석에서 유도체화된 발리올아민-PIC가 나타난 313.4 m/z와 합치되는 것이다.(도 1 참조)

<44> **실시예 2: 미생물 배양배지에 포함된 발리올아민의 적정 유도체화 조건**

<45> 본 실시예에서는 발리올아민을 실제 미생물 배양배지에 첨가한 후 발리올아민을 페닐 이소시아네이트를 사용하여 유도체화시키는데 있어서 최적의 유도체화 조건을 확인하기 위한 것이다.

<46> Epeendorf 튜브에서 200 mg/L의 발리올아민이 첨가된 미생물 배양배지(글루코오스 50 g/L, soybean flour 36 g/L, 펩톤 5 g/L, CaCO_3 4 g/L) 500 μ L와 아세토니트릴 (ACN) 500 μ L을 혼합하였다. 이를 원심분리기에서 10분간 10,000 rpm으로 원심분리한 후, 상등액 800 μ L를 취하여 20mL 유리 바이알 (glass vial)로 옮겨 이를 50°C 진공오븐에서 건조시켰다.

<47> 먼저 최적 페닐 이소시아네이트의 농도를 결정하기 위하여 건조물에 DMSO 750 μ L를 첨가하여 건조된 시료를 완전히 용해시킨 후 15 g/L의 트리에틸아민 150 μ L와 여러 농도의 페닐이소시아네이트 100 μ L를 첨가하였다. 이 반응용액을 30°C에서 30분간 방치하였다. 도2는 첨가되는 페닐이소시아네이트 농도에 따라 반응 후 생성된 유도체 피크의 면적을 나타내었다.

<48> 도 2에서 보듯이 2.5mM의 페닐이소시아네이트를 사용 시 생성되는 유도체의 피크면적은 최고치의 12% 수준이었다. 반면 PIC 50.4 mM 이상 사용 시 spike 배양배지로부터 유도체화된 발리올아민의 최대 피크 영역을 관찰하였다. 이는 발리올라민을 페닐이소시아네이트로 유도체화시키기 위해서는 충분한 양의 페닐이소시아네이트를 사용하여야 한다는 것을 시사한다.

<49> 최적 반응온도와 시간을 결정하기 위하여 페닐이소시아네이트 농도를 50.4 mM로 고정시킨 후 실험을 수행하였다. 즉, 건조물에 DMSO 750 μ L를 첨가하여 건조된 시료를 완전히 용해시킨 후 15 g/L의 트리에틸아민 150 μ L와 503.7mM의 페닐이소시아네이트 100 μ L를 첨가하였다. 이 반응용액을 반응온도와 반응시간에 따라 생성된 발리올아민-페닐이소시아네이트 피크들의 면적을 비교하였다. 각 온도 및 시간 조건별 유도체화 시험을 수행하고 얻어진 피크 영역 결과와 함께 하기표 1 및 도 2에 정리하였다.

표 1

No1	반응 온도 (°C)	반응시간 (분)	상대 피크 면적(%)
1	30	15	74.9 $\pm$ 7.0
2		30	100.0 $\pm$ 11.3
3		60	97.4 $\pm$ 10.7
4	50	15	47.7 $\pm$ 13.9
5		30	61.3 $\pm$ 20.2
6	70	15	56.7 $\pm$ 11.2
7		30	55.8 $\pm$ 15.2

<51> 상기 표 1 및 도 2에서 보듯이, 피크 영역을 감안할 때 적절한 유도체화 조건은 30°C에서 15-30분 범위 내이며, 최적의 유도체화 조건은 30°C에서 30분인 것을 확인할 수 있었다.

<52> **실시예 3: 선택도**

<53> 상기 언급한 바와 같이, 화학/효소 반응 또는 미생물을 이용한 발리올아민 유도체 생산 공정에는 반응물인 발리다마이신, 중간생성물인 발리엔아민과 발리올아민, 최종생성물인 발리올아민 유도체인 보글리보스가 존재하게 된다. 이들 물질들은 발리올아민과 구조가 비슷할 뿐만 아니라 아민기(-NH₂)기를 갖고 있으므로 발색단 시약과 반응하여 이들의 유도체가 생성되고 이는 HPLC를 이용한 발리올아민 유도체 분리에 악 영향을 미칠 수 있다. 이의 방지를 위해서는 HPLC 칼럼의 이동상 용매의 최적 용매 조성을 결정하여야 한다.

<54> 이에 본 실험에서 사용한 HPLC 칼럼의 이동상 조성은 아세토나이트릴: 0.5 mM sodium octyl sulfate가

포함된 물=10:90이고 유속은 1 mL/min이다.

<55> 도 3은 100 mg/L의 발리올아민과 100 mg/L의 발리엔아민을 포함한 배양 배지를 유도체화 시킨 후 분석된 HPLC 피크이다. 그림에서 보듯이 두 물질의 유도체는 잘 분리된다. 이는 발리올아민에 대한 출발 물질로서 발리엔아민의 존재는 발리올아민의 HPLC 분석을 간섭하지 않음을 확인할 수 있었다.

<56> 실시예 4: 정밀도와 정확도

<57> 본 실시예에서는 발색단 시약에 의한 발리올아민의 유도체화를 통해 HPLC 분석을 수행하는 데 있어서 정밀도와 정확도를 알아보기 위한 것이다. 먼저 배양 배지에 표준발리올아민 저장용액을 첨가하여 제조된 25mg/L, 50mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L의 용액을 상기의 방법으로 유도체화를 수행한 후 이의 HPLC 분석을 수행하였다. 각 농도 대 피크 면적을 도시하여 검량선을 작성하였다.

<58> 한편 상술한 배양배지에 표준 발리올아민 저장용액을 첨가하여 제조된 30mg/L, 60mg/L, 90mg/L의 용액을 상기의 방법으로 유도체화를 수행한 후 이의 HPLC 분석을 수행하였다. 각 농도별로 생성된 피크의 면적을 구하고 상기의 검량선을 바탕으로 측정농도를 계산하였다. 이를 알고 있는 농도와 비교함으로써 정밀도와 정확도를 측정하였으며, 각각 시료를 동일한 날에 분석을 수행하여 얻은 결과와 각각 다른 날에 수행하여 얻은 결과들의 정확도와 정밀도를 측정한 결과를 표 2에 정리하였다.

표 2

이론 농도 (mg/L)	Intra-day repeatability			Inter-day repeatability		
	측정 농도 (mg/L)	상대표준편차 (%)	상대오차 (%)	측정 농도 (mg/L)	상대표준편차 (%)	상대오차 (%)
30	25.7± 6.0	23.3	-14.3	24.5± 3.9	15.9	-18
60	68.4± 0.6	0.9	14	63.7± 1.6	2.5	6.2
90	88.4± 4.0	4.6	-1.8	86.2± 1.2	1.3	-4.2

<60> 상기표 2에서 보듯이, 본 분석방법의 정확도와 정밀도가 상당히 높음을 확인할 수 있다.

<61> 실시예 5: 발리올아민-페닐이소시아네이트 유도체의 안정성

<62> 본 실시예에서는 발리올아민-발색단 시약 유도체의 보관 안정성을 알아보기 위한 것이다.

<63> 최근의 HPLC 분석에서 자동시료 주입기 (auto-sampler)를 사용하고 있다. 대부분의 자동시료주입기는 상온이므로 유도체화된 시료가 상온에서 안정한지를 알아보아야 한다. 상술한 배양 배지에 표준발리올아민을 첨가하여 제조된 60mg/L, 90mg/L의 용액을 상기의 방법으로 유도체화를 수행한 후 반응 직후의 시료와 24시간 상온에서 방치한 시료의 HPLC 분석을 수행하여 피크 면적을 비교하고 하기표 3에 정리하였다.

표 3

발리올아민 (mg/L)	HPLC 피크 면적 (10 ⁴)		상대 피크 면적 (%)
	반응 직후	24시간 후	
60	114.3± 8.6	127.3± 13.1	111
90	209.2± 7.9	228.6± 19.2	109

<65> 상기표 3에서 보듯이, 본 발명에 의해 형성된 유도체는 24시간 까지는 상당히 안정적임을 확인할 수 있다.

산업이용 가능성

<66> 본 발명에 따르면, 발리올아민을 발색단 시약, 특히 페닐이소시아네이트로 유도체화시킴으로써 발리올아민의 검출 민감도를 극대화시켜 HPLC를 사용하여 UV 검출기로 발리올아민을 분석하기에 적합하다.

도면의 간단한 설명

<67> 도 1는 발리올아민 표준용액과 페닐이소시아네이트를 이용하여 유도체 형성의 가능성을 알아보기 위한 것으로, (A)와 (B)는 각각 blank에 대한 고성능 액체 크로마토그래피와 질량 크로마토그래피 결과이고, (C)와

(D)는 본 발명의 유도체 시료에 대한 고성능 액체 크로마토그래피와 질량 크로마토그래피 결과이다.

<68>

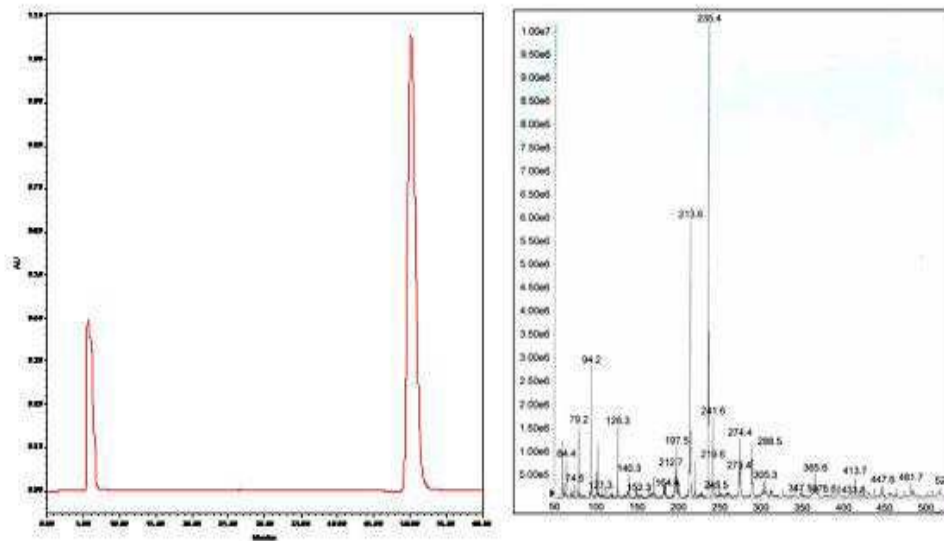
도 2는 미생물 배양 배지에 포함된 발리올아민 (200 mg/L)의 유도체화 생성에 대한 페닐이소시아네이트 농도별 효과를 도시한 도면이다 (30℃에서 30분간 반응).

<69>

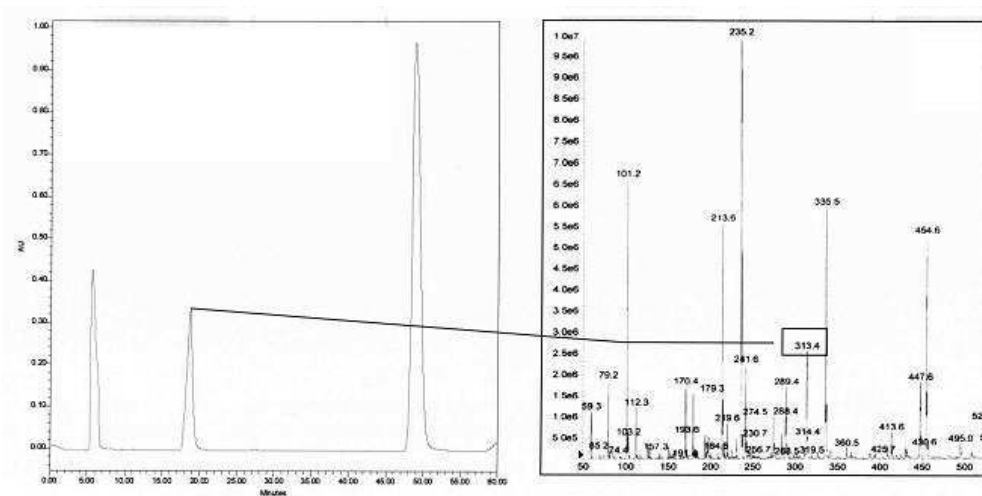
도 3은 미생물 배양배지에 포함된 발리올아민 (100mg/L)와 발리엔아민 (100 mg/L) 유도체에 대한 고성능 액체 크로마토그래피 결과를 도시한 도면으로서, (A)는 시료의 미생물 배양배지성분, 발리올아민 및 발리엔아민을 (B)는 미생물 배양 배지(blank)를 나타낸다.

도면

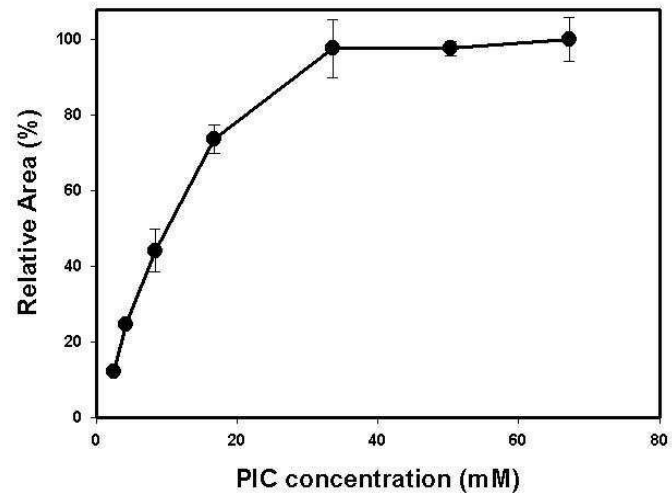
도면1a



도면1b



도면2



도면3

