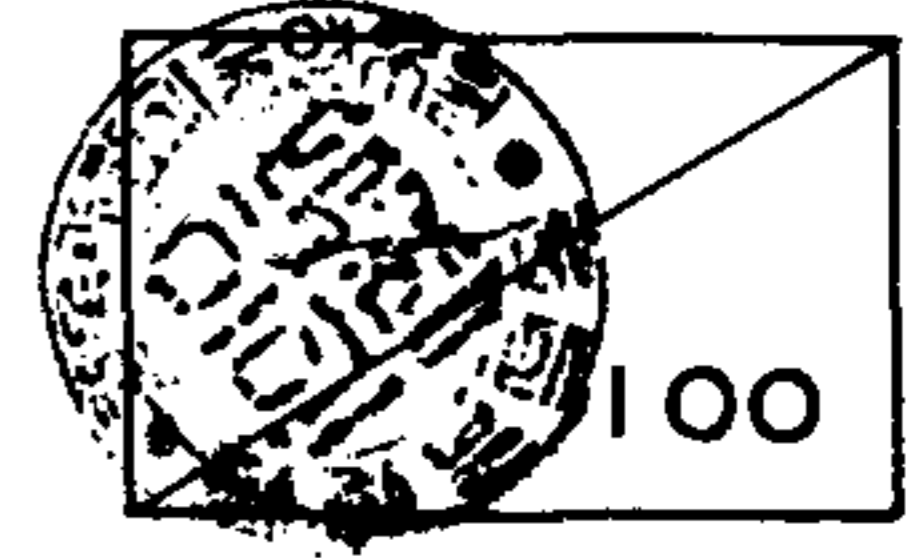


1 차년도
연차보고서



광학이성질체의 분리에 관한 연구

A Study on the Separation of Optical Isomer

연구기관
한국과학기술연구원

과학기술연구원

1
장

11

8

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "특정물질의 정제 및 분석에 관한 연구"의 세부과제인 "광학이성질체의 분리에 관한 연구(1차)" 사업의 연차보고서로 제출합니다.

1990. 7.

연구기관명	한국과학기술연구원
총괄연구책임자	김택제(한국과학기술연구원)
연구책임자	김택제(한국과학기술연구원 책임연구원)
연구원	이재성(한국과학기술연구원 선임연구원)
	어연우(한국과학기술연구원 연구원)

여 백

제 출 문

I. 제 목

광학이성질체의 분리에 관한 연구 (1차)

II. 연구의 목적 및 중요성

아미노산의 광학 이성질체를 분리하는 방법을 확립하고 식품이나 생체에 있는 광학이성질체를 분리 정량하여 영양학이나 생화학적인 관계를 연구한다. 제약 부분에서 이성질체중 한쪽만 약효가 있다고 연구되었는데 약품의 이성질체를 분리함으로써 부작용을 유발하는 한쪽 광학이성질체를 제거할 수 있는 기술을 축적한다는 것이 본 연구의 목적이다.

광학이성질체의 분리는 한국에서 정립되지 않은 방법으로 생리적으로나 약리적으로 대단한 중요성이 있다. 생체내에서 합성되는 것은 *l*-form만 존재하지만 시간이 감에 따라서 racemization이 되어 *d*-form이 존재하게 된다. 이것을 이용하여 나이를 추정할 수 있으며 생체내 현상을 예측할 수 있다. 약리 현상도 정확한 연구를 위하여 이성질체의 분리 기술이 적절히 요청된다.

III. 연구의 내용 및 범위

현재 우리의 신체를 구성하고 있는 필수 아미노산 20여가지를 본 연구의 대상으로 삼았고 내부 표준물질인 norleucine을 포함

하고 가수분해중 깨져버리는 것을 제외하여 총 38종의 d. l -form의 아미노산을 검색의 대상으로 삼았다. 표준 아미노산 및 free 아미노산의 이성질체를 측정하였고 단백질은 한국산 콩, 된장, 고추장, 간장, 백내장, 분유를 시료로 취하여 산 가수분해한 후 Dowex 50w - ×12를 통하여 clean up한 후 esterification과 acylation을 해 유도체를 만들어 chirasil val GLC column을 사용하여 분리하였다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. Alltech사의 chirasil val column을 사용하여 carrier gas 3mL/min, make up gas 30mL와 oven 온도 70°C에서 4분 유지하고 210°C까지 분당 3°C 승온함으로써 38종의 아미노산 중 28종의 아미노산을 분리하는데 제일 좋은 조건이었다.
2. 아미노산의 유도체화후 48시간내의 농도 변화를 대략 3%이내이었고 농도에 대한 오차를 줄이기 위해 유도체화후 즉시 분석하였다.
3. TFA, PFP, HFB를 사용하여 acylation을 하였을때 TFA-IPA의 경우에 제일 좋은 분리능을 보여주어서 유도체는 TFA-IPA를 통일하였다.
4. FID와 NPD의 값도 비교에서 NPD의 감도가 좋았으나 Tailing

이 많이 생기고 감도를 예측하기 어려우며 농도와 직선성이 좋지 않기 때문에 FID를 고정하여 측정하였다.

5. *l*-form의 아미노산을 가수분해 조건과 유도체를 하는 동안 racemization되는 양은 무시할 정도이다.
6. 이성질화가 일어나는 아미노산은 alanine, aspartic acid, glutamic acid, phenyl alanine으로 식물성 시료인 된장에서는 d-alanine이 검출되었으나 동물성 시료인 백내장과 분유에서는 검출되지 않았다. 제일 연령추정등 생리적으로 이용이 적절한 것은 분리능과 함량을 비교하였을 때 aspartic acid이고 glutamic acid는 phenyl alanine과 분리정도가 좋지 못하였고 양도 문제가 있어서 사용하기가 어려운 상태이었다.
7. d-form 아미노산의 분율은 가정용된장이 3~6% 시판용 된장이 약 3%, 간장이 2~4%, 콩이 약 1%, 백내장 시료에 1~2% 또 분유내에서는 1.0~1.5%로 검출되었으며 미생물의 발효시 광학이성질체의 변환이 현저함을 알 수 있다.

V. 계획과 실적의 대비표

구분 연구내용	당초계획 진도												진도 (율)	
	'89 7	8	9	10	11	12	'90 1	2	3	4	5	6		
1. 자료 수집 정리	→	→												10
2. 시약구입 정제		→	→											50
3. GLC에 의한 최적분리			→	→										10
4. LC(IEC)에 의한 분리방식					→	→								10
5. 분리능에 미치는 인자의 최적조건								→	→					5
6. on-line absolute identification 시도									→	→				10
7. 보완·보고서 작성												→	→	5
총진도율	5	5	10	10	10	10	10	10	10	10	5	5	100	

SUMMARY

I. Title

“A Study on the Separation of Optical Isomer” (The first Report)

II. The Purpose and Importance of the Project

After establishment of methodology for the separation and quantitation of optical isomer existed in food or biomaterial, the relationship between isomer and nutrient or biochemical aspect was investigated. Because one of isomer reveals much higher physiological effect, it is one of important our research goal to get rid of one of isomer generating bad side effects.

Though the technique for the separation of optical isomer is not well established in Korea, its importance covers the area of physiological aspect and pharmaceutical aspect. Inside of biological system, only the l-form will be synthesized followed by minimal racemization to d-form amino acids. Therefore we can deduce the age of body or biological reaction by using this phenomenon. At the same time, for exact pharmaceutical effect, technique for the separation of optical isomer becomes vital.

III. Contents of the Research

The target of isomer during first part of research was about 20 essential amino acids composed of our body including internal standard norleucine. Total 38 amino acids were tested for this purpose. The optical isomer of standard amino acids and free amino acids were quantitized and the protein were isolated from the Korean bean, pasted bean, soy sauce, gochujang, cataract and powdered milk which was hydrolyzed and clean up through Dowex 50w-x12 followed by esterification and acylation in order for GLC analysis with chirasil val column.

IV. Results and Suggestions

1. The optimum condition with chirasil val column was obtained by adjusting carrier gas 3mL/min and make up gas 30mL/min at oven temperature of 70°C initially, increasing the temperature at the rate of 3°C/min upto 210°C for the separation of 28 amino acids.
2. The area fluctuation after 48 hours since its derivatization was about less than 3%. In order to reduce error generated from derivatization, sample was introduced to GLC just after its derivatization.
3. Among acylation method with TFA, PFP, HFB, TFA-IPA has shown the best resolution and the stability, therefore TFA-IPA derivatization was adopted all through the experiment.

4. By comparison of FID and TSD, TSD has shown the better sensitivity than that of FID. But due to tailing by TSD and the difficulty for expectation and poor linearity, FID was used as GLC detector which is sufficient at this range of sample.
5. The ratio of racemization of l-form amino acids during the hydrolysis and derivatization was negligible.
6. The amino acids showing the racemization was alanine, aspartic acid, glutamic acid and phenyl alanine. The sample from vegetable contains d-alanine including pasted bean and soy sauce, whereas sample from the animal, cataract and powdered milk, did not contain d-alanine. The most convenient optical isomer in order to deduce age and biological purpose was aspartic acid compared to glutamic acid and phenyl alanine showing poor resolution and small quantity.
7. The ratio of d-form amino acids in home made pasted bean was 3-6%, for commercial pasted bean was ranged about 3%, for soy sauce was ranged 2-4%, for bean it was ranged about 1%, for cataract it was 1-2%, for powdered milk the ratio was between 1.0-1.5% showing the racemization by micro organism was significant.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Experimental Material and Method	21
1. Standard Materials and Reagents	21
2. Analytical Instrument and Apparatus	22
3. Experimental Method	22
(1) The condition of GLC	22
(2) Derivatization of Standard Amino Acids	24
(3) Pretreatment of Samples	24
Chapter 3. Results and Discussion	29
1. Choice of Column and Its Condition	29
2. Reproducibility of Area	29
3. Resolution with various Derivatizations	33
4. The Sensitivity of Amino Acids Derivatized with FID & NPD ...	41
5. Separation of Standard d,l-Amino Acids	42
6. Grouping of 38 Amino Acids	46
7. The possibility of Racemization of l-form Amino Acids	49
8. Quantitation of optical Isomer in Korean Pasted Bean and Bean	49

9. Quantitation of optical Isomer in Korean Soy sauce & Gochujang	54
10. Quantitation of optical Isomer in Cataract	59
11. Quantitation of optical Isomer in Powdered Milk	63
Chapter 4. Conclusion	69
References	70

목 차

제1장 서론	15
제2장 실험 재료 및 방법	21
제1절 표준물질 및 시약	21
제2절 분석기기 및 장치	22
제3절 실험 방법	22
1. GLC의 조건	22
2. 표준아미노산의 유도체	24
3. 시료의 전처리	24
제3장 결과 및 고찰	29
1. 컬럼의 선택 및 GC의 조건	29
2. Area의 재현성	29
3. 유도체별 분리능 검토	33
4. FID와 NPD에 의한 아미노산 유도체들의 감도변화	41
5. d,l-표준아미노산 유도체의 분리	42
6. 38종 아미노산의 A,Bgroup 분리	46
7. l-form 아미노산의 이성화 가능실험	49
8. 한국산 된장, 콩에서의 d,l-아미노산의 정량	49
9. 한국산 간장, 고추장에서 d,l-아미노산의 정량	54

10. 백내장시료 중에서 d,l-아미노산의 정량	59
11. 분유중에서의 광학이성질 아미노산의 정량	63
제 4 장 결 론	69
참 고 문 헌	70

제1장 서론

광학이성질체는 chiral center를 가진 서로 겹쳐지지 않는 거울상 대칭형이며 enantiomer라 부르며 이런 enantiomer가 섞여있는 상태를 racemate라 한다.

Enantiomer는 물리적, 화학적 성질이 동일하여 구별하기 어렵고 다만 다른 광학이성질체와의 구조적 상호작용과 편광의 회전 각도가 다르게 된다. 아울러 효소의 작용이나 kinetic연구, X-Ray crystallography에 대한 연구에서도 입체적인 배치상태가 서로 다른 역할을 함이 밝혀졌다. 1980년에 출간한 미국 의약대사전을 보면 거울상 이성질체는 합성의약품중 약 85%가 racemate로 판매되고 있으나 대부분 거울상 이성질체 의약품 중 오직 한쪽만이 의약적 효능이 있다고 보고 되었다. 즉, 대부분 의약의 효능은 거울상 이성질체의 혼합물의 특성(흡착, 분배, 생리현상, 배설작용)으로서 평가하지만, 많은 경우에 거울상 이성질체가 서로 다른 의약적 활성을 지니고 있음이 판명되었다. 이런 결정적인 예가 1960년대 미국에서 수면제로 널리 쓰였던 thalidomide로서 수면작용을 주는 것은 R-(+)-enantiomer이나 S-(-)-enantiomer은 임신초기에 산모가 복용할 경우 기형아가 나올 확률이 높은 반면 수면작용은 없음이 1979년에 밝혀졌다. 반면에 R-form은 기형아 형성에 관여하지 않았다. 따라서 신의약을 합성하여 정확한 약리효과 및 생리효과를 연구하는데 본 연구의 중요성이 있으며, 부작용을 유발하는 한쪽

광학이성질체를 분리후 제거할 수 있는 기술을 축적함으로써 제약 산업에도 보탬이 되도록 하는것이 본 연구의 목표이다.

생리적인 면에서 보면 광학이성질체의 선택성이 더욱 뚜렷해진다. catecholamine은 신체내 생성된 물질로서 tyrosine의 생합성에 의해서 생성되며 혈압조절과 기타 몸의 조절작용에 영향을 주고있는 중요한 조절성 호르몬이다. catecholamine의 생합성 바로 직전의 물질은 L-dopa (3-hydroxy-L-tyrosine)로서 카르복실기가 떨어져 dopamine이 형성한다. parkinson병의 치료는 일반적으로 환자의 L-form의 dopamine을 증가시킴으로 수행될 수 있다. 합성의약의 stereochemistry의 중요성은 R-(-)-epinephrine이나 R-(-)-isopropyl norepinephrine이 20배 내지 80배 반대 이성질체보다 효능이 더 좋다는데 찾아 볼 수 있다.

광학이성질체를 분리하는데 있어서 최초로 공헌한 사람은 1948년 파스퇴르로서 (+),(-)-tartaric acid의 결정을 현미경과 편석을 이용하여 분리하였다. 이것은 역사적인 입장에서 중요한 mechanical separation이지만 응용면에서는 대단히 한정되어 있다. sodium ammonium tartrate 경우에도 27°C 이상에서는 이 방법을 사용할 수 없다¹. 광학이성질체 분리의 다른 방법중 하나로 chiral reagent와 두 이성질체간 반응속도 차이를 이용한 kinetic 방법인데 한 이성질체의 천이 상태의 에너지가 서로 다름을 이용한 것이다. allene의 racemate가 optically active한 borane과 반응할때 덜 반응성이 있는 allene이 농축되어 분리되었다^{2,3}.

효소도 여러종류의 생리적 천이에 촉매작용을 하며 한쪽 광

학 이성질체와 선택적으로 반응함으로 racemate를 분리할 수 있다.

초기의 크로마토그래피법은 그들의 일부 성공적인 면에도 불구하고 지루하고 일반적으로 응용하기에 적합하지 못하였다^{4,5}. 따라서 크로마토그래피를 이용한 enantiomer의 분리는 많은 어려운 점도 뒤따랐다. 그러나 장점으로는 resolving agent나 이성질체의 순도 등 조건이 까다롭지 않고 시료의 손실이 적으며 일반 시료에 적용할 때처럼 열역학적이거나 이론적인 지표들을 얻어낼수 있다는 점이다⁶. 고전적 거울상 이성질체 분리법과 다른 방법의 하나로서 크로마토그래피는 이성질체의 고전상이나 첨가물의 매개체와 분석물질의 상호작용을 이용한 최신의 분리방법이다. 즉, 짧은 시간동안 거울상 이성질체를 부분입체 이성질체로 형성하여 분리를 가능하게 하는 법으로서 안정한 착물을 형성할수록 더 분리가 잘 되어지고 있다.

광학이성질체를 분리할 수 있는 기기로 대별한다면 GC와 LC가 있고, chiral compound의 위상의 입장에서 보면 이성질체를 이동상에 첨가하는 경우와 이성질체를 고정상에 immobilize시켜서 이용하는 방법으로 대별할 수 있다. 서로 작용하는 분리메카니즘별로 살펴보면 삼차원적 착화합물을 이용한 분리법, inclusion complex를 이용한 분리방법, 또 Hydrophobic interaction과 Hydrogen bonding 등 molecular interaction에 의한 분리방법으로 나뉘어 질 수 있다. GC의 아미노산 분석법은 polar한 아민기와 초산기를 masking하기 위해서 acylation과 esterification을 한 다음 capillary column을 사용하여 분리할 수 있다. 기타 많은 생리활성 유기물질도 이 방법을

사용하여 분리가 가능할 것이나 GC를 사용한 방법은 몇가지 어려운 점이 있다. 첫째 분리하려는 시료가 잘 기화하여야 되고, 높은 컬럼온도에서도 부분입체이성질체 혼합물질의 무질서도(entropy)가 어느정도 차이가 있어야 한다. 또 컬럼자체의 높은 온도로 chiral정 지상이 racemate로 되어서 시간이 지남에 따라서 이성질체의 선택성이 없어져 버리고 말뿐더러 많은 양의 시료를 분취하기가 어렵다. 아울러 분석시료 자체의 racemization 반응이 일어날 우려도 있다. 이러한 이유로 LC에 의한 거울상 이성질체의 분리가 시도되어 많은 진전을 보게 되었다.

LC에 의한 방법은 GC에 의한 방법보다 resolution면이나 경제적인 취약성에도 불구하고 70~80% 유기 racemate를 분리하는데 사용될 수 있다. Three point interaction을 기초로 한 Pirkle type정 지상은 reverse phase에 불안정한 단점을 지닌다. 이것보다는 현재 덜 사용하고 있는 cyclodextrin을 기초로 한 column이 주요 생리 활성물질에 대해서 좋은 결과를 보여주고 있고 앞으로의 연구에 많은 기대가 모아지고 있다.

Ligand exchange방법을 사용한 것으로 주로 reverse phase컬럼을 사용하였고 금속으로는 Cu^{2+} , Ni^{2+} 등을 사용하였다. Nimura⁷등은 picomole의 AA를 N-(p-toluenesulfonyl)-L-phenylalanine을 넣어서 분리하였고 Lindner⁸등은 (R,R)-tartaric acid mono-n-octylamide를 Kuniwa⁹등을 N,N-dioctyl-L-alanine을 C_{18} 에 입혀서 hydrophobic한 AA를 분리하였고 Armani¹⁰등은 L-aminoacylamide를 집어 넣어서 Dansyl AA를 Feibush¹¹등은 N-w-(dimethylsiloxyl)-undecanoyl-L-valine

을 Lepage¹²등은 diethylene-triamine을 넣어서 Takeuchi¹³등은 β -cyclodextrin을 집어 넣어서 Gilson¹⁴등은 L-aspartylcyclohexylamide를 첨가해서 Lam¹⁵은 L-proline과 구리를 첨가하여 광학이성질체 아미노산을 분리하였다. 이동상에 광학이성질 첨가물을 넣는 방법 이외에도 three point interaction을 하는 Pirkle형태의 정지상을 이용할 수 있는데 Pirkle¹⁶등은 합성한 정지상으로 광학이성질체의 다양한 분석방법을 시도하였고 Hyun¹⁷은 Π -acidic과 Π -basic 부분을 갖는 정지상을 개발하여 사용하였고 Hara¹⁸등은 이성질체 아마이드를 immobilized한 정지상을 Bank¹⁹등은 pirkle의 전통적 정지상을 Pochapsky²⁰등은 n-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino산 유도체를 Yamashita²¹등은 binaphthalene 유도체를 정지상에 Salvadori²²등은 L-lactic acid를 정지상으로 하여 유도체된 AA를 Finn²³등은 pirkle형 정지상으로 arylalkyl carbinol을 분리하였다. Cyclodextrin을 정지상에 고정시키는 법도 최근에 도입하였는데^{24~36} 내포착물을 형성함으로써 Guest-Host분자의 상호작용으로 정지상이 안정하면서 분리능이 우수한 반면 적용범위가 pirkle type보다 광범위하지 못한 단점이 있다. 다른 정지상으로 단백질³⁷이라던지 triacetyl cellulose³⁸, Riboflavin등도 사용하고 있다. SFC^{39,40}도 이용되는 경우도 있고 Mass도 동원이 된 경우도 있다^{41,42}. GC는 오래전부터 광학이성질체를 분리하는데 이용되어 왔고^{43~54} 주로 유도체를 만들어 시료의 휘발성을 높인 다음에 사용하였다. 주로 유도체화 반응에서는 아민기와 알콜, 초산기등 작용기를 이용하여 polar group을 masking하게 되는데 주로 acylation과 esterification을 하게 된다. GC에서 acylation 반응을 이

용하는 것은 2-chloroisovaleryl chloride^{58~61}, (s)-2-methoxy-2-trifluoro methyl phenyl acetyl chloride^{62,63} (-)methyl chloro-formate⁶⁴ 등의 시약을 사용하였고 esterification의 반응을 이용한 것은 2-phenyl propionyl chloride⁶⁵, 2-phenyl butyryl chloride⁶⁶, o-acetyl lactic chloride^{67,68} 2-alkanol⁶⁹, (+) 4-methyl-2-pentyl amine⁷⁰을 사용하였다. LC를 사용할 때의 acylation은 N-carboxy-anhydride^{71~73}, N-TFA-propyl chloride⁷⁴, (-)-1-methoxy-1-methyl-1-(2-naphthyl) acetic acid⁷⁵를 사용하였다. LC에서 esterification 반응은 MTPA-Cl^{76,77}, 1-(4-nitrophenyl) ethyl amine⁷⁸, methyl phenyl alaninate⁷⁹ 등이 보고 되었다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 표준 물질 및 시약

1. 표준 아미노산 42종은 Sigma Chem. Co. (U.S.A.)제로 5.0mg을 정확히 취한 다음 0.2N HCl로 녹여 100mL Volumetric flask에 옮기고 100mL되게 채운다. 이 용액을 5.0mL 피펫하여 사용하였으며 내부 표준 물질인 L-norleucine은 12.6mg을 단 다음 0.2N HCl로 녹여 100mL Volumetric flask에 옮기고 100mL 되게 채운 다음 2.0mL 피펫하여 사용하였다.

2. 시 약

N(O)-trifluoroacetic anhydeide (TFA), pentafluoropropionic anhydride (PFP), heptafluoro butylic anhydride (HFB)은 Alltech associates, INC. (U.S.A.)제이며 isopropyl alcohol은 Burdick & Jackson, acetyl chloride는 Aldrich chemical company inc., DOWEX 50w-x12 ion exchange resin H⁺form (200~400 mesh)은 REGIS Chem. Co., HCl 및 NH₄OH 용액은 J.T. Baker Chemical Co., ethyl chloroformate은 Fluka 제를 사용하였다.

제 2 절 분석기기 및 장치

GLC는 Varian Vista 6000 (U.S.A.)로 검출기는 flame ionization detector (FID)와 thermionic specific detector (TSD 또는 NPD)며 Vista 402 chromatograph data systme을 사용하여 분석 자료 및 chromatogram을 얻었다. 광학이성질체의 amino acid를 분리하기 위하여 GC column은 길이 20m 내경 0.53mm chirasil Val (Alltech associates, INC.)을 사용하였다. clean up column은 teflon stopcock가 부착된 30cm × 10mm id pyre × column (Arthur H. Thomas Co., U.S.A.)을 사용하였다.

제 3 절 실험 방법

1. GLC의 조건

GLC의 검출기는 FID와 TSD이며 chirasil val capillary column을 사용하였고 carrier gas(He)는 분당 3mL, make-up gas(He)는 분당 30mL씩 흘렸고 fuel gas로 FID에서는 수소 30mL/min, 공기 300mL/min, TSD에서는 수소 4.5mL/min 공기 175mL/min로 조절하여 사용하였다. oven온도는 70°C에서 4분 유지하고 210°C까지 분당 3°C승온하여 25분간 유지시켰다. 이상의 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Gas Chromatographic Condition for the Determination of Amino Acid after Derivatization.

Gas Chromatograph	Varian vista 6000 Data system vista 402
Column	Capillary column 20m x 0.53mm Chirasil val
Oven temperature	<p>70°C — 4min — 3°C/min — 210°C — 25min</p>
Detector	Flame Ionization Detector(FID) Temperature ; 270°C
Injector	Direct injector Temperature ; 230°C
Gas flow rate	Carrier gas He ; 3ml/min make-up gas 30ml/min H ₂ 30ml/min Air 300ml/min

2. 표준아미노산의 유도체

표준아미노산을 GC의 chromatogram에서 겹치지 않는 범위내에서 2개의 group (A : 29종, B : B종, Table 2)로 나누어 5mL (각각 0.25mg)씩 취하고 내부표준물질 2mL (0.252mg)을 취하여 100mL 넓적 바닥 플라스크에 혼합후 40°C 물중탕 회전 진공 증발기에서 완전히 수분을 제거하고 acetyl chloride/isopropyl alcohol (2:8, v/v) 혼합액 0.5mL를 가한 다음 ultrasonic cleaner에서 용해시킨후 teflon cap으로 되어있는 test tube에 옮긴다. 이것을 110°C oven에서 1시간 반응 시킨후 실온으로 냉각시켜 질소 가스로 과잉의 시약을 날려 보낸다. 여기에 0.3mL methylene chloride와 perfluorocarboxylic anhydride (TFA, PFP, HFB) 0.2mL을 가하여 뚜껑을 막은 다음 110°C oven에서 30분 반응후 냉각시킨다. 이것을 다시 질소가스로 과잉의 시약을 날려 보낸후 histidine을 반응시키기 위하여 0.2mL benzene과 0.1mL ethyl chloroformate을 가하고 110°C oven에서 30분 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 질소가스로 과잉의 시약을 날려 보낸후 ethyl acetate 0.2mL로 녹여 GC에 0.5 μ l 주입시킨다.

3. 시료의 전처리

시료는 시중에 판매되고 있는 된장, 고추장, 분유, 메주콩과 가정에서 재래식으로 제조한 된장, 고추장, 간장을 선택하였고 백내장 환자의 눈에서 떼어낸 단백질과 치아 중 dentine을 시료로 삼아 아미노산의 광학이성질체 분리를 하였다. 된장, 고추장, 흰콩은

Table 2. Two Groups of Amino Acids

1. A Group (29 Amino Acids)

d, l- Alanine, d, l- Valine, Glycine, d, l- Isoleucine, d, l- Leucine, d, l- Cystein,
d, l- Aspartic Acid, d, l- Tryptophan, d, l- Proline, d, l- Hydroxy Proline (Cis),
d, l- Methionine, d, l- Glutamic Acid, l- Phenyl Alanine, d, l- Tyrosine, d, l- Ornithine,
d, l- Lysine

2. B Group (8 Amino Acids)

d, l- Threonine, d, l- Serine, l- Proline, d - Phenyl Alanine, d, l- Histidine

건조하여 미세하게 마쇄하여 처리했으며 그 외의 것은 수분이 있는 상태에서 처리하였다. 시료는 protein으로 25mg 정도 달아서 마개가 있는 15mL test tube에 넣고 6N HCl 10mL을 넣은 다음 질소가스로 공기를 날려보내고 질소가스를 충전한 다음 마개를 막아서 110°C oven에서 24시간 분해시켰다. 이것을 실온으로 냉각시켜 여과하여 50mL 메스플라스크에 채우고 그중 10mL를 취하여 내부 표준물질 2mL을 첨가한 후 DOWEX 50W-X12 충전시킨 관 (resin 10cm)에 넣고 용리시킨 후 다시 재증류수 5mL씩 2번 용리시켜 불순물을 제거하고 7N NH₄OH 10mL와 재증류수 10mL을 차례로 용리시켜 100mL 넓적바닥 플라스크에 용리액을 받아 감압 농축하여 표준아미노산 유도체와 같은 과정으로 처리하였다.

유리아미노산은 곱게 마쇄한 시료를 정확히 평량하여 삼각플라스크에 넣고 증류수 30mL을 가한 후 100°C 물중탕에서 30분간 추출시킨 다음 이 추출액을 경사법으로 모으고 잔사에 증류수 30mL로 재추출하고 냉각하여 증류수 100mL로 세척하고 여과하여 전부 합한것을 추출액으로 하였다. 이 용액에 trifluoroacetic acid 5mL을 가한후 원심분리하여 침전물을 제거하고 내부 표준물질을 넣어 감압 농축하여 resin을 통과하고 유도체를 만들었다. Figure 1은 단백질 시료로부터 가수분해하고 clean up해서 유도체를 만들어 GC로 분석하는 과정을 도식화한 것이고, Figure 2는 free AA를 얻기 위한 방법을 도식화한것이다.

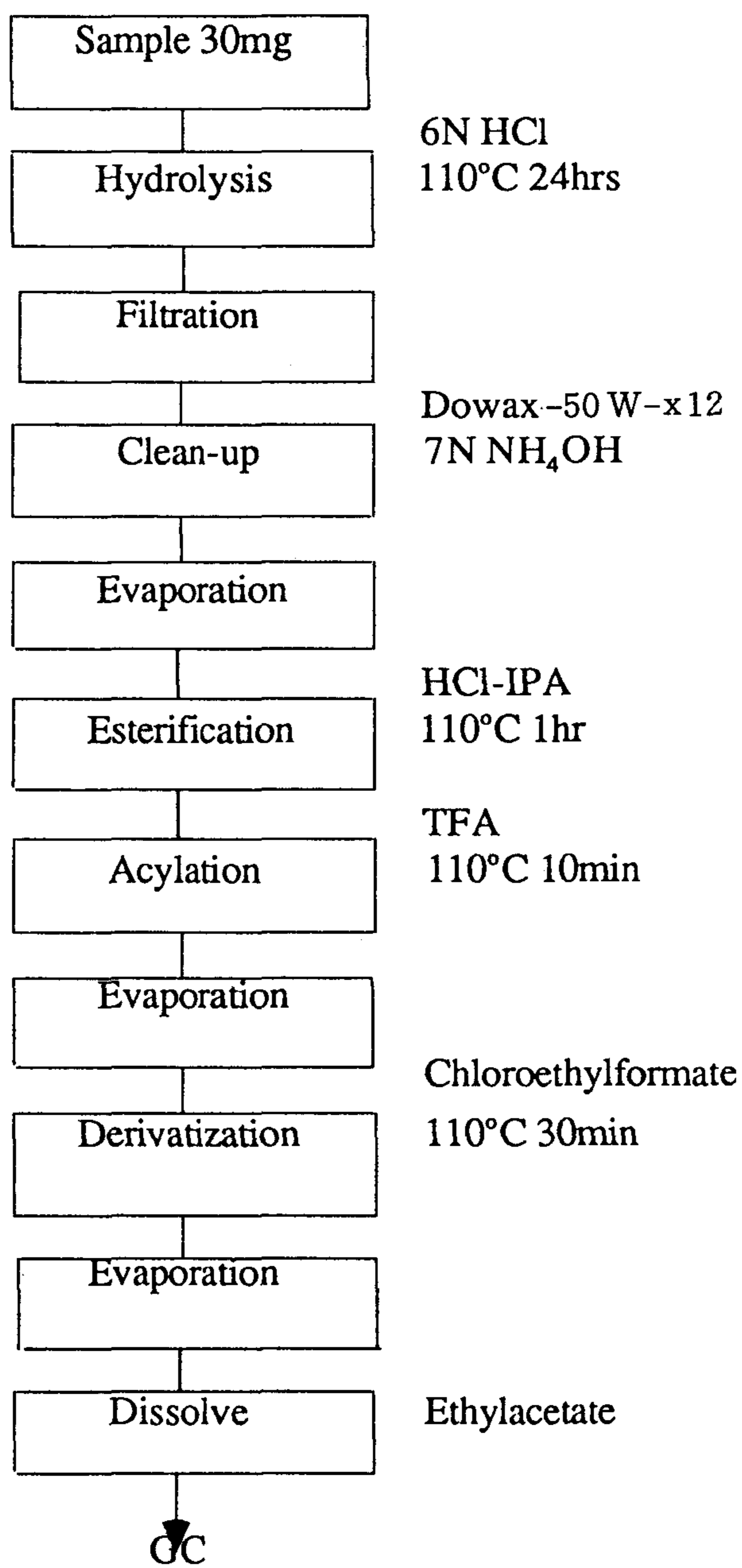


Figure 1. Flow Chart of Sample Preparation from Protein.

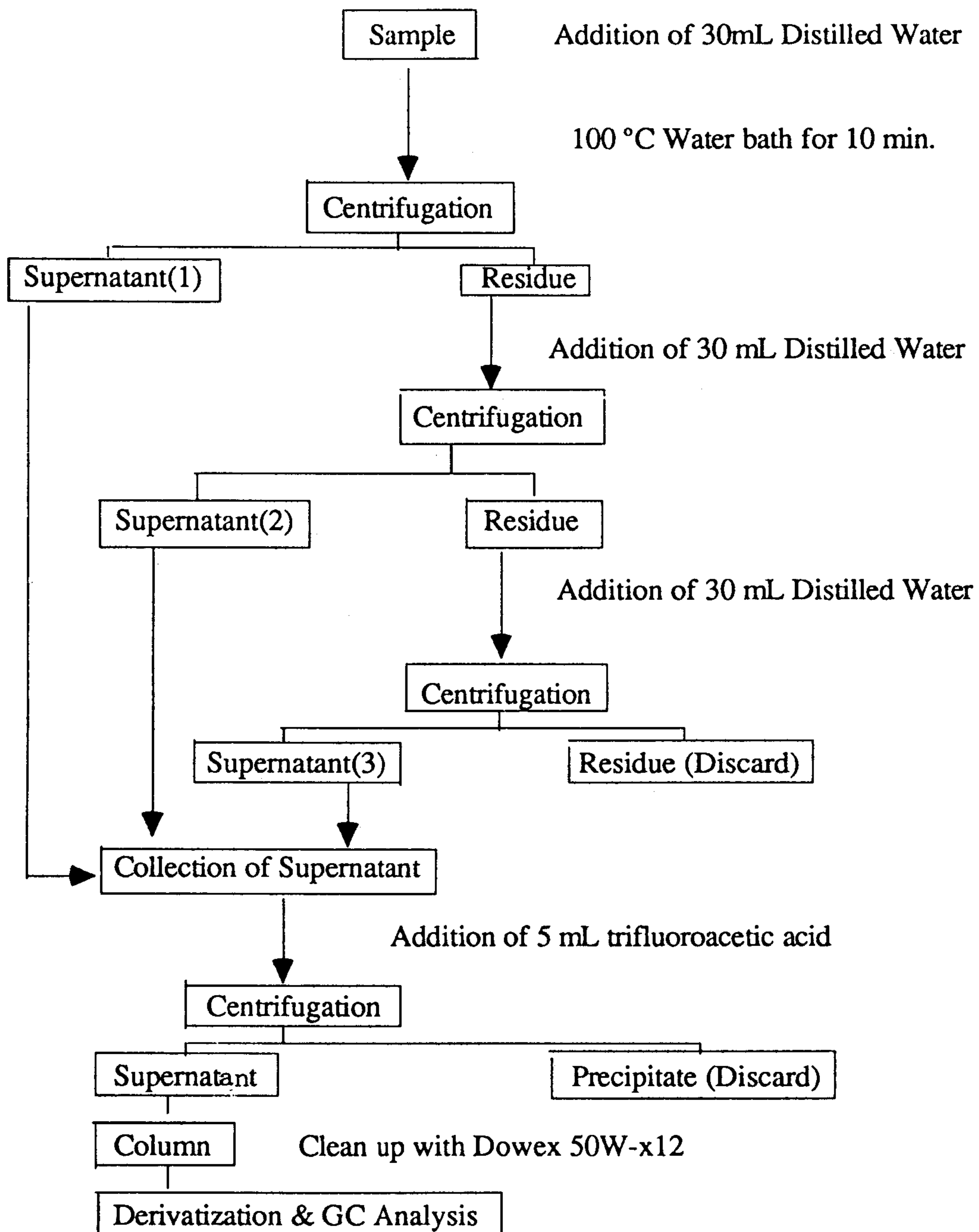


Figure 2. Separation of Free Amino Acids from the sample.

제3장 결과 및 고찰

1. Column의 선택 및 GC의 조건

아미노산 광학이성질체 분리를 위한 GC column은 시판되고 있는 chirasil-val III NON-PAKD (Alltech Co., U.S.A.)을 구입 사용하였다.

아미노산 D, L체를 이소프로필 에스테르화한 후 trifluoro acetic anhydride와 반응시킨 유도체를 분리하기 위하여 GC의 조건은 carrier gas(He) 3mL, make up gas(He) 30mL와 oven의 온도를 70°C에서 4분간 유지하고 210°C까지 분당 3°C승온함으로써 38종의 아미노산 중 28종의 아미노산을 분리하는데 가장 좋은 조건이었다. GC column은 길이 50m, 안지름 0.25mm와 길이 25m, 안지름 0.53mm와 비교했을때 분리능에 차이는 거의 없었다.

2. Area의 재현성

아미노산 유도체의 안정성을 보기 위하여 상온에서 시간 변화(0, 24, 48시간)에 따른 내부표준물질과의 peak면적 비율을 내어 조사하였다.(Figure 3, Table 3) 38종의 아미노산 중 29종은 상대표준편차가 3% 이하이었으며 D,L-methionine, L-glutamic acid, D,L-tryptophan은 상대표준편차가 3.2~4.7% 범위이었으나, D,L-tyrosine 8.9%로 시간이 경과할수록 점점 peak 면적이 감소함을 알 수 있었다. 특히 D,L-histidine은 15.5%, 10.6%로 시간 경과에 따른 peak 면

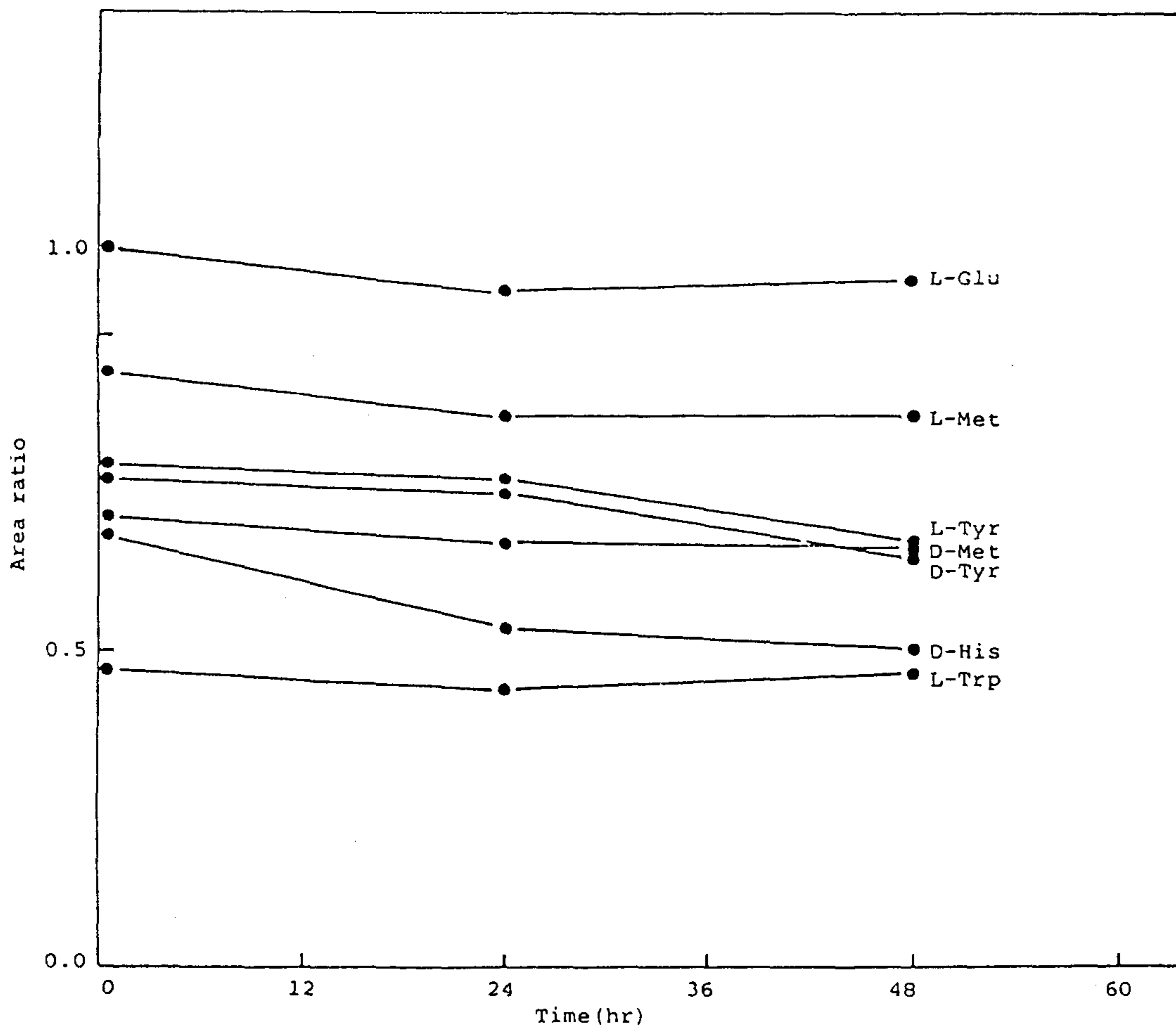


Figure 3. Stability of selected TFA-IPA derivatives in enantiomeric amino acids.

Table 3. Reproducibility of Area at different Time with FID

Amino Acid	Enantiomer	Time Passed(Hrs)			Mean	RSD(%)
		0	24	48		
Alanine	d	0.720	0.724	0.709	0.718	1.08
	l	0.966	0.984	0.968	0.973	1.01
Threonine	d	0.816	0.811	0.820	0.816	0.55
	l	0.930	0.919	0.933	0.927	0.79
Valine	d	0.909	0.919	0.908	0.912	0.67
	l	0.828	0.832	0.834	0.831	0.37
Glycine		1.106	1.094	1.108	1.103	0.69
Isoleucine	d	0.508	0.505	0.503	0.505	0.50
	l	0.711	0.712	0.704	0.709	0.61
Serine	d	0.824	0.807	0.791	0.807	2.04
	l	1.010	0.989	0.975	0.991	1.78
Leucine	d	1.118	1.117	1.121	1.119	0.19
	l	1.253	1.253	1.253	1.253	0
Norleucine	l	1.000	1.000	1.000	1.000	0
Proline	d	1.119	1.112	1.111	1.114	0.39
	l	1.182	1.177	1.171	1.177	0.47
Cysteine	d	0.500	0.494	0.491	0.495	0.93
	l	0.924	0.917	0.912	0.918	0.66
H. Proline (Trans)	l	1.282	1.271	1.218	1.257	2.72
Aspartic A.	d	0.877	0.840	0.862	0.860	2.16
	l	0.905	0.916	0.920	0.914	0.89
H.Proline (Cis)	l	1.768	1.724	1.726	1.739	1.43
Methionine	d	0.713	0.671	0.658	0.681	4.22
	l	0.938	0.866	0.866	0.890	4.67
Glutamic A.	d	0.766	0.749	0.753	0.756	1.18
	l	1.143	1.071	1.092	1.102	3.36
P. Alanine	d	1.490	1.487	1.458	1.478	1.20
	l	1.175	1.208	1.168	1.184	1.80

Table 3. (continued)

Amino Acid	Enantiomer	0	Time Passed		Mean	RSD(%)
			24	48		
Tyrosine	d	0.769	0.738	0.646	0.718	8.91
	l	0.797	0.770	0.671	0.746	8.89
Ornithine	d	0.572	0.576	0.566	0.571	0.88
	l	0.561	0.554	0.563	0.559	0.85
Lysine	d	0.768	0.736	0.779	0.761	2.94
	l	0.601	0.583	0.582	0.589	1.82
Histidine	d	0.675	0.536	0.509	0.573	15.54
	l	0.853	0.691	0.803	0.782	10.60
Tryptophan	d	0.492	0.456	0.498	0.482	4.71
	l	0.471	0.444	0.467	0.461	3.61

적이 현격히 감소하므로 유도체를 만든 후 즉시 GC에 주입하여 정량함으로써 면적 감소에 따른 오차를 줄일 수 있다.

3. 유도체별 분리능 검토

아미노산의 D, L form의 유도체별 분리능을 보기 위하여 isopropyl 에스테르에 N(O)-trifluoroacetic anhydride (TFA), N(O)-pentafluoropropionic anhydride (PFP), N(O)-heptafluorobutylic anhydride로 acylation을 시켜 retention time과 분리능을 조사하였다. (Fig. 4, 5, Table 4) 42종의 아미노산중 D,L-arginine과 D,L-cystine은 반응이 가지않아 유도체를 만들 수 없었다. TFA-IPA 유도체에서는 (Fig. 6) proline과 hydroxyproline은 D, L form이 완전히 겹쳐 한개의 peak로 나타났으며 D-threonine과 D-valine, L-isoleucine과 D-serine, D-leucine과 D-serine도 서로 다른 아미노산끼리 겹쳤다. D form과 L form의 resolution number은 alanine이 3.56으로 가장 크며 histidine이 0.66으로 가장 작은 값을 나타내었고 용리 시간은 50.3분 소요되었다. PFP-IPA유도체에서도 (Fig. 7) D-leucine과 L-serine, D-proline과 L-proline, D-hydroxyproline과 L-hydroxyproline이 겹쳐 하나의 peak로 나타났으며 TFA-IPA보다 조금 빨랐다. HFA-IPA유도체는 (Fig. 8) 분리능이 제일 좋지 못하였는데 용리시간은 48.1분으로 PFP-IPA와 비슷하였다. 3개의 유도체중에서 TFA-IPA유도체가 가장 좋은 분리능을 나타내었으며 시료중 아미노산 분석의 유도체는 TFA-IPA로 통일하였다.

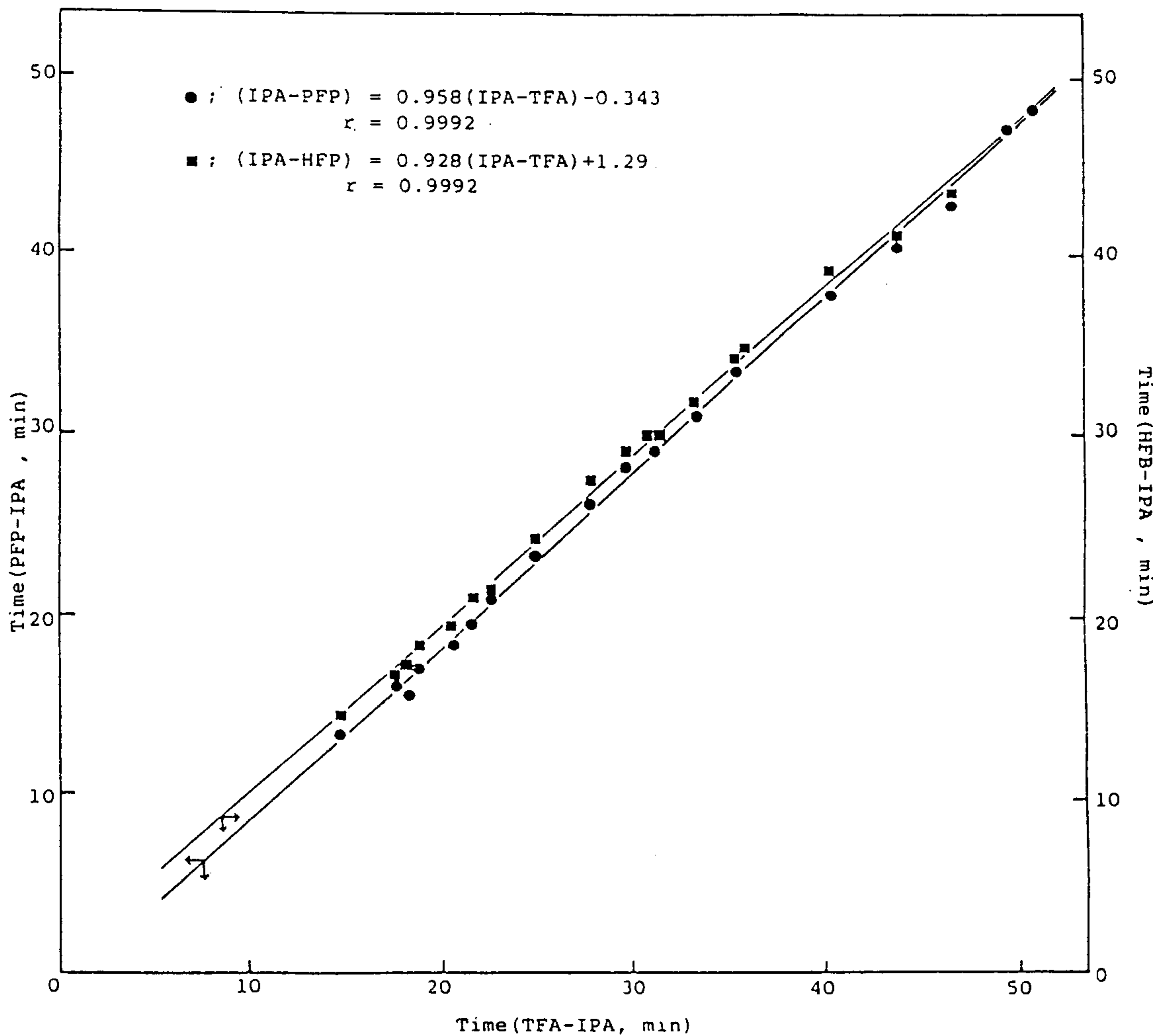


Figure 4. Correlation between TFA-IPA and PFP-IPA, and HFB-IPA derivatives of l-Amino Acids. ●: TFA-IPA vs. PFP-IPA, ■: TFA-IPA vs. HFB-IPA.

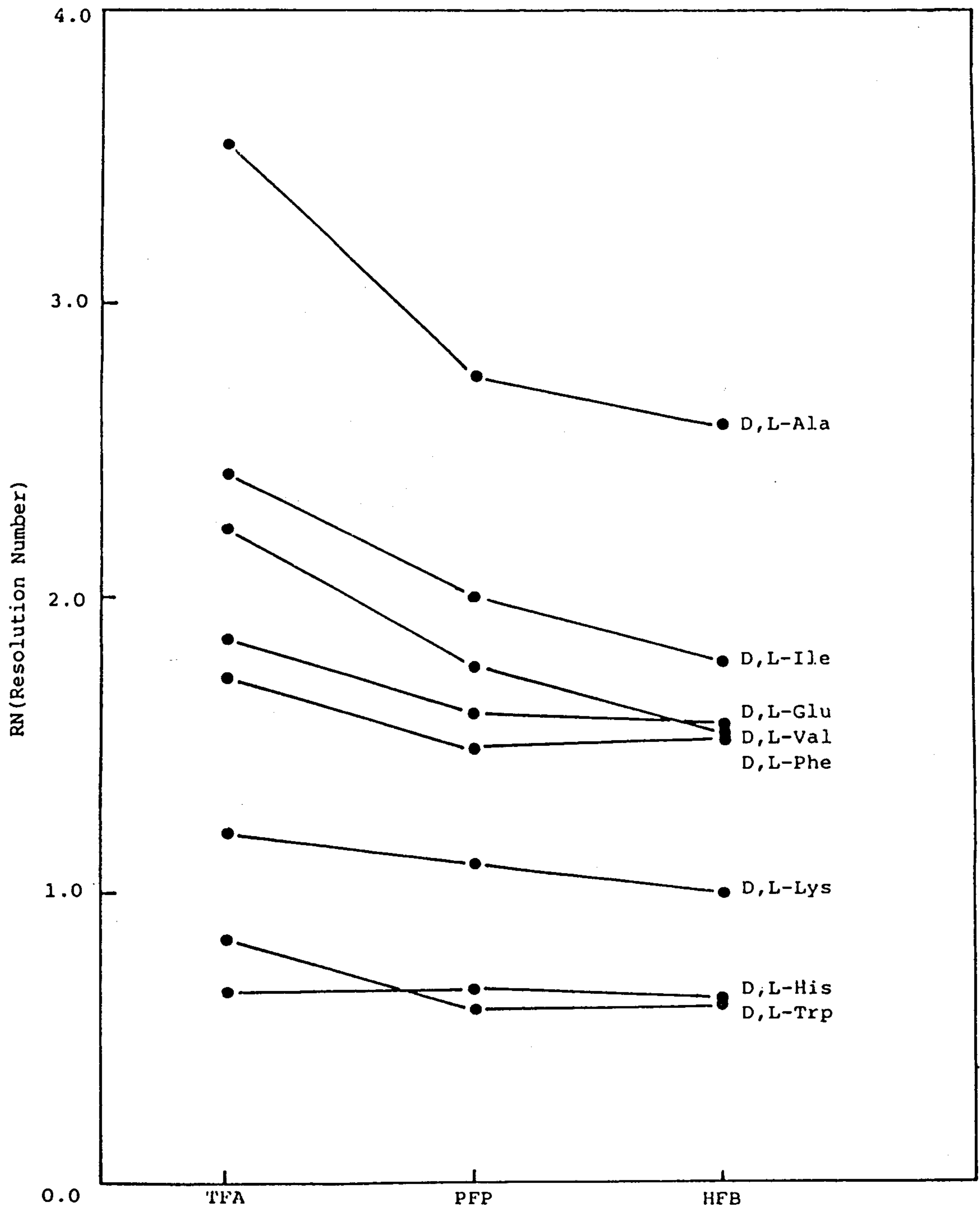


Figure 5. Effect of perfluoroacyl substituents on resolution of several enantiomeric amino acids.

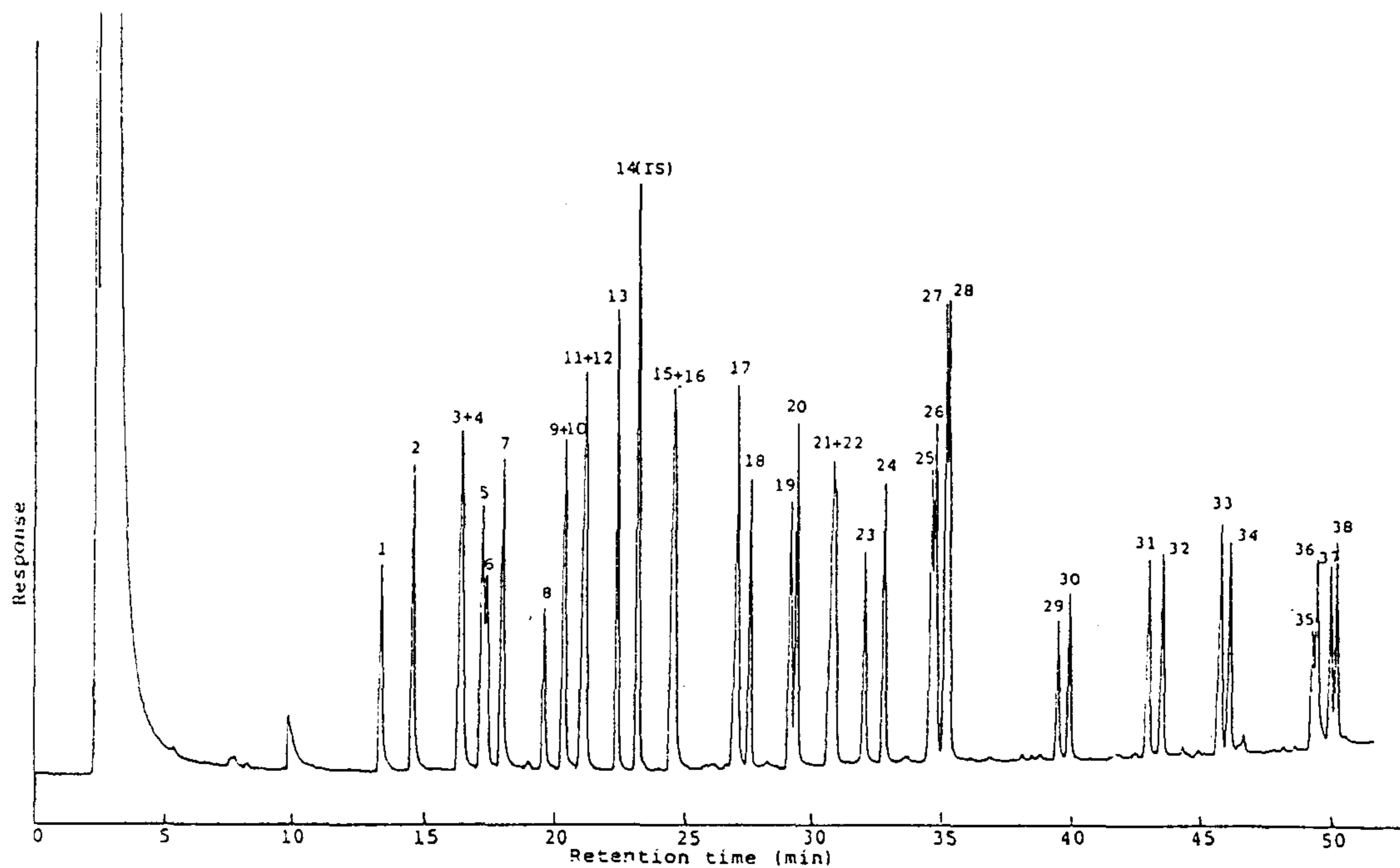


Figure 6. Chromatogram of TFA-IPA derivatives of d,l-Amino Acids mixture with FID.
 Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 3. d-threonine, 4. d-valine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 8. d-isoleucine, 9. l-isoleucine, 10. d-serine, 11. d-leucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 15. d-proline, 16. l-proline, 17. d-cysteine, 18. l-cysteine, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 21. d-hydroxy proline(cis), 22. l-hydroxy proline(cis), 23. d-methionine, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 26. d-phenyl alanine, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 29. d-tyrosine, 30. l-tyrosine, 31. d-ornithine, 32. l-ornithine, 33. d-lysine, 34. l-lysine, 35. d-histidine, 36. l-histidine, 37. d-tryptophan, 38. l-tryptophan.

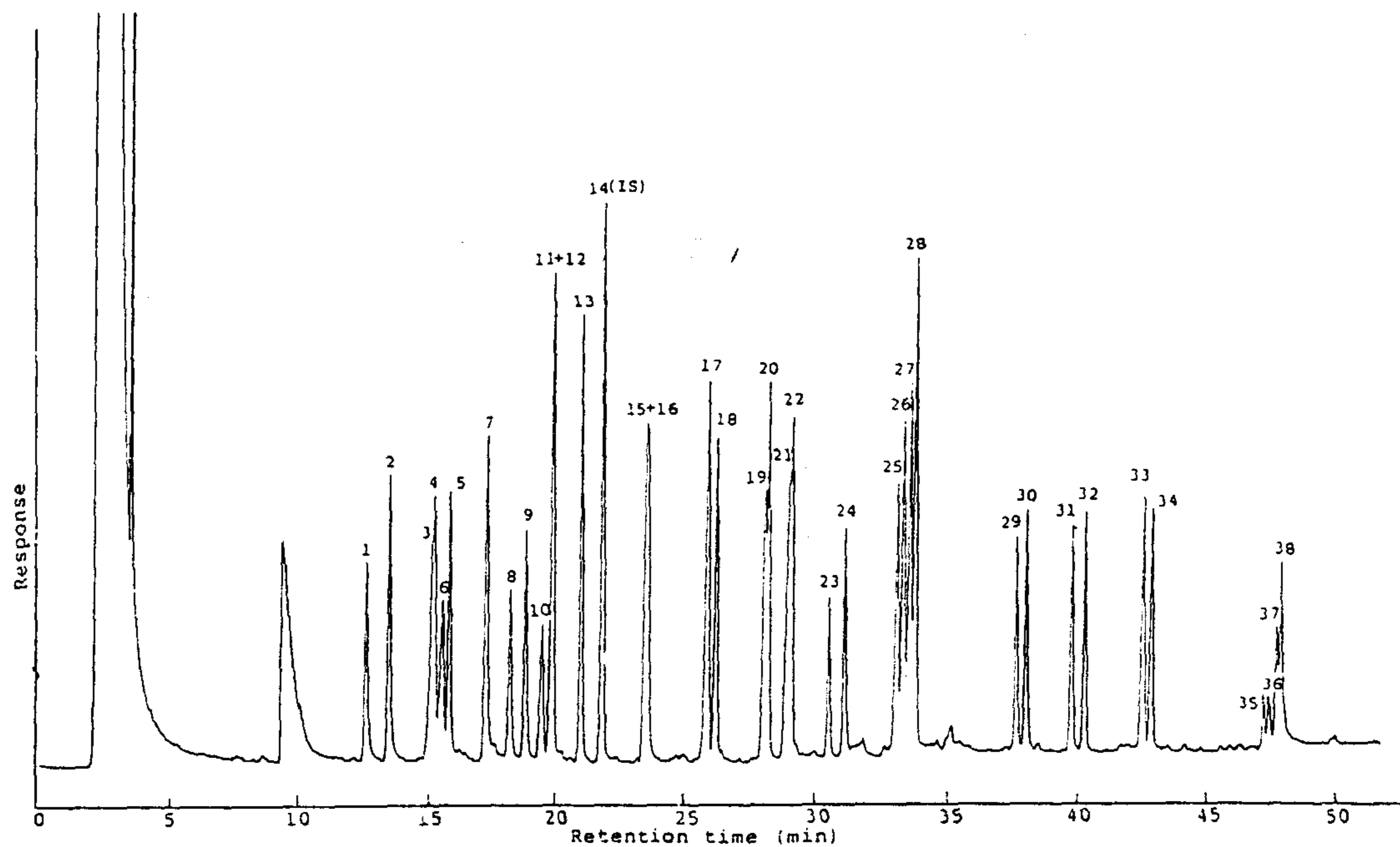


Figure 7. Chromatogram of PFP-IPA derivatives of d,l-Amino Acids mixture with FID.
 Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 3. d-threonine, 4. d-valine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 8. d-isoleucine, 9. l-isoleucine, 10. d-serine, 11. d-leucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 15. d-proline, 16. l-proline, 17. d-cysteine, 18. l-cysteine, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 21. d-hydroxy proline(cis), 22. l-hydroxy proline(cis), 23. d-methionine, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 26. d-phenyl alanine, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 29. d-tyrosine, 30. l-tyrosine, 31. d-ornithine, 32. l-ornithine, 33. d-lysine, 34. l-lysine, 35. d-histidine, 36. l-histidine, 37. d-tryptophan, 38. l-tryptophan.

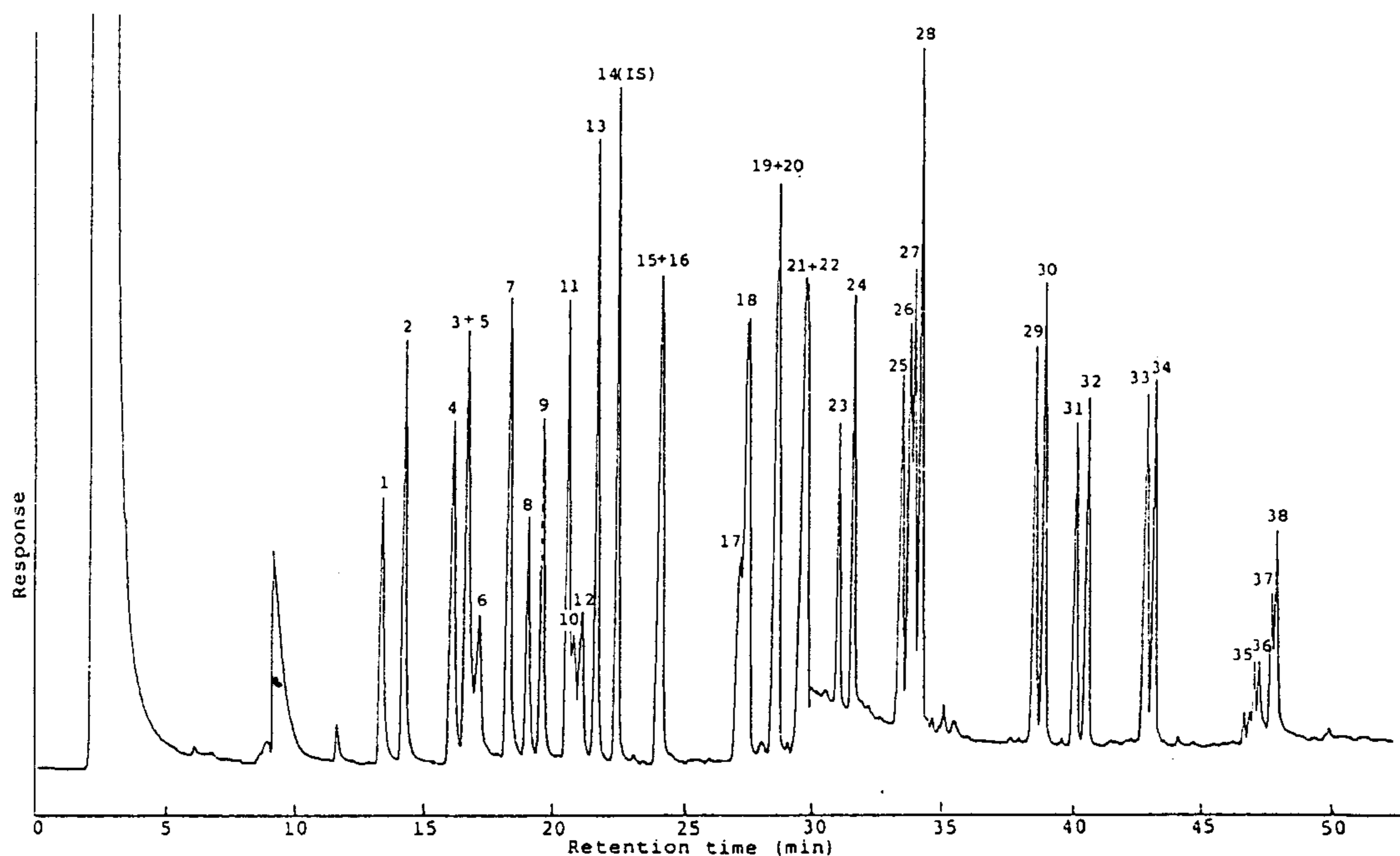


Figure 8. Chromatogram of HFB-IPA derivatives of d,l-Amino Acids mixture with FID.
 Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 3. d-threonine, 4. d-valine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 8. d-isoleucine, 9. l-isoleucine, 10. d-serine, 11. d-leucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine (IS), 15. d-proline, 16. l-proline, 17. d-cysteine, 18. l-cysteine, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 21. d-hydroxy proline (cis), 22. l-hydroxy proline (cis), 23. d-methionine, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 26. d-phenyl alanine, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 29. d-tyrosine, 30. l-tyrosine, 31. d-ornithine, 32. l-ornithine, 33. d-lysine, 34. l-lysine, 35. d-histidine, 36. l-histidine, 37. d-tryptophan, 38. l-tryptophan.

Table 4. Retention Time(RT) and Resolution Number(RN) N(O)-perfluoroacyl amino Acid isopropyl ester

Amino Acid	Enantiom	TFA-IPA			PFP-IPA			HFP-IPA		
		RT	α	RN	RT (min)	α	RN	RT	α	RN
Alanine	d	13.40	0.85		12.57	0.58		13.60	0.60	
	l	14.61	0.63	3.56	13.51	0.62	2.76	14.49	0.64	0.26
Valine	d	16.43	0.71		15.32	0.70		16.33	0.72	
	l	17.19	0.74	2.25	15.92	0.73	1.77	16.86	0.75	1.56
Threonine	d	16.43	0.71		15.32	0.70		16.86	0.75	
	l	17.37	0.75	2.75	15.64	0.72	0.95	17.30	0.77	1.31
Glycine	-	17.97	0.77	-	17.36	0.79	-	18.45	0.82	-
Isoleucine	d	19.52	0.84		18.26	0.83		19.14	0.85	
	l	20.35	0.87	2.44	18.86	0.86	2.02	19.68	0.87	1.79
Serine	d	20.35	0.87		19.51	0.89		20.91	0.93	
	l	21.17	0.91	2.38	19.94	0.91	1.43	21.23	0.94	1.08
Leucine	d	21.17	0.91		19.94	0.91		20.70	0.92	
	l	22.44	0.96	3.11	21.04	0.96	3.67	21.82	0.97	3.73
Norleucine	l	23.28	1.00	-	21.87	1.00	-	22.60	1.00	-
Proline	d	24.69	1.06		23.60	1.08		24.28	1.07	
	l	24.69	1.06	NM	23.60	1.08	NM	24.28	1.07	NM
Cystein	d	27.16	1.17		26.02	1.19		27.39	1.21	
	l	27.65	1.19	1.65	26.35	1.21	1.11	27.73	1.23	1.14
Aspartic A.	d	29.25	1.26		28.20	1.29		28.90	1.28	
	l	29.50	1.27	0.85	28.36	1.30	0.51	28.90	1.28	NM
H. Proline	d	30.91	1.33		29.17	1.33		29.94	1.32	
	l	30.91	1.33	NM	29.23	1.34	0.36	29.99	1.33	0.20
Methionine	d	32.13	1.38		30.69	1.40		31.23	1.38	
	l	32.87	1.41	2.47	31.31	1.43	2.05	31.80	1.41	1.89

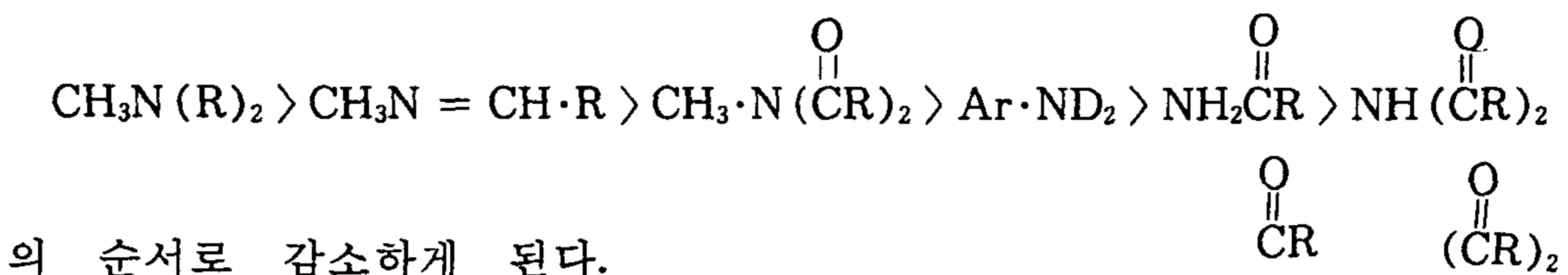
Table 4. (continued)

Amino Acid	Enantiomer	<u>TFA-IPA</u>			<u>PFP-IPA</u>			<u>HFB-IPA</u>		
		RT	α	RN	RT	α	RN	RT	α	RN
Glutamic A.	d	34.70	1.49		33.27	1.52		33.66	1.49	
	l	35.25	1.51	1.85	33.76	1.54	1.61	34.13	1.51	1.57
Phenyl Alanine	d	34.86	1.50		33.51	1.53		33.95	1.50	
	l	35.39	1.52	1.75	33.96	1.55	1.51	34.42	1.52	1.54
Tyrosine	d	39.69	1.70		37.80	1.73		38.92	1.72	
	l	40.14	1.72	1.50	38.18	1.75	1.26	39.30	1.74	1.25
Ornithine	d	43.09	1.85		39.97	1.83		40.50	1.79	
	l	43.61	1.87	1.72	40.46	1.85	1.63	40.95	1.81	1.48
Lysine	d	45.79	1.97		42.68	1.95		43.14	1.91	
	l	46.15	1.98	1.21	44.01	1.97	1.10	43.45	1.92	1.03
Histidine	d	49.33	2.12		47.34	2.16		47.22	2.09	
	l	49.53	2.13	0.66	47.55	2.17	0.68	47.42	2.10	0.65
Tryptophan	d	50.07	2.15		47.85	2.19		47.89	2.12	
	l	50.32	2.12	0.84	48.04	2.20	0.61	48.08	2.13	0.63

4. FID와 NPD (TSD)에 의한 아미노산유도체들의 감도변화

Flame ionization detector (FID)와 Nitrogen phosphorous Detector (NPD) 혹은 Thermionic specific detector (TSD)를 사용하는 경우는 측정원리가 다소 다르기 때문에 감도에서 자연적으로 차이가 나게 된다. (Fig. 6,9) CN과 P의 radical생성에 의해서 감도가 증가하는 TSD는 아미노산중의 아민기의 존재로 아미노산의 측정에 있어서 감도가 증가하게 된다. 이렇게 감도가 증가하는 반면 TSD는 화학구조 형태에 영향을 받게되고 일반적인 감도의 증가경향을 예측하기 어렵기 때문에 표준물질과의 비교가 정량에서 주요한 역할을 하게되어 1개의 내부표준물질을 이용하여 전체를 정량하는 경우에 있어서 바람직하지 못하게되고 농도에 따른 직선성도 떨어지기 때문에 넓은 범위 농도의 정량에 이용하기가 좀 어렵게 된다.

Phosphorous의 경우는 산소화합물일 경우는 감도가 2~4배 동일 종류의 P분자를 기준으로 할때 감소한다. 질소를 함유하는 시료는 화학적구조가 CN의 라디칼 형성반응에 더욱 많은 영향을 미친다. 즉 질소원자열에 산소가 있거나 카보닐그룹이 옆에 있을 때 더욱 비효과적으로 된다. TSD의 감도의 세기는



FID와 TSD의 감도를 비교하였을 때 Histidine (29.1배), Trans-H-proline (21.7배), Glycine (15.8배), Ornithine (7.5배)등 감도가 많이

증가하는것이 있는반면 Threonine (1.94배), Valine (2.8배), Tyrosine (1.5배)와 같이 감도의 증가 대단치 않은것도 있어 화학구조의 영향이 서로 다르게 감도에 영향을 미침을 알 수 있다.

아미노산에서 감도가 증가하는 순서대로 조사한다면 hydroxyl group이 붙어있어 산소원자가 옆에있는 경우 (Threonine, Tyrosine)가 제일 감도가 떨어지고 다음이 hydrocarbon chain이 있어 flexibility가 있는것 (valine, alanine, isoleucine, leucine)이 가지들의 자유운동으로 말미암아 에너지가 quenching됨으로써 감도가 많이 떨어지고 acetic group이 있는 aspartic acid, glutamic acid등이 다음으로 감도가 약 5배정도 증가하였다. sulfur를 포함하는 cystein이 11.5배로 감도가 증가하였고 질소를 포함한 아미노산, 즉 ornithine, lycine, tryptophan이 15배 이상으로 감도가 증가하였고 nitrogen을 포함하면서도 ring을 형성하고 있는 histidine과 (trans)-H-proline이 20배 이상의 감도가 증가되고 있다. 따라서 radical의 안정도에 기여하는 ring이나 전자를 주는 group이 있으면 감도가 증가하는 반면 전자를 끄는 산소나 vibration에 의해 에너지를 소화시키는 hydrocarbon chain이 있을때 감도가 급격히 감소된다는 것이 밝혀졌다. (Figure 9, Table 5)

5. d, l-표준아미노산 유도체의 분리

TFA-IPA를 사용하여 유도체화한 후 38종의 표준아미노산을 GC로 분리하면 Figure 6과 같은 chromatogram이 얻어진다. 이때 접치는것 12개를 제외한 26개의 아미노산은 좋은 분리능을 보여주

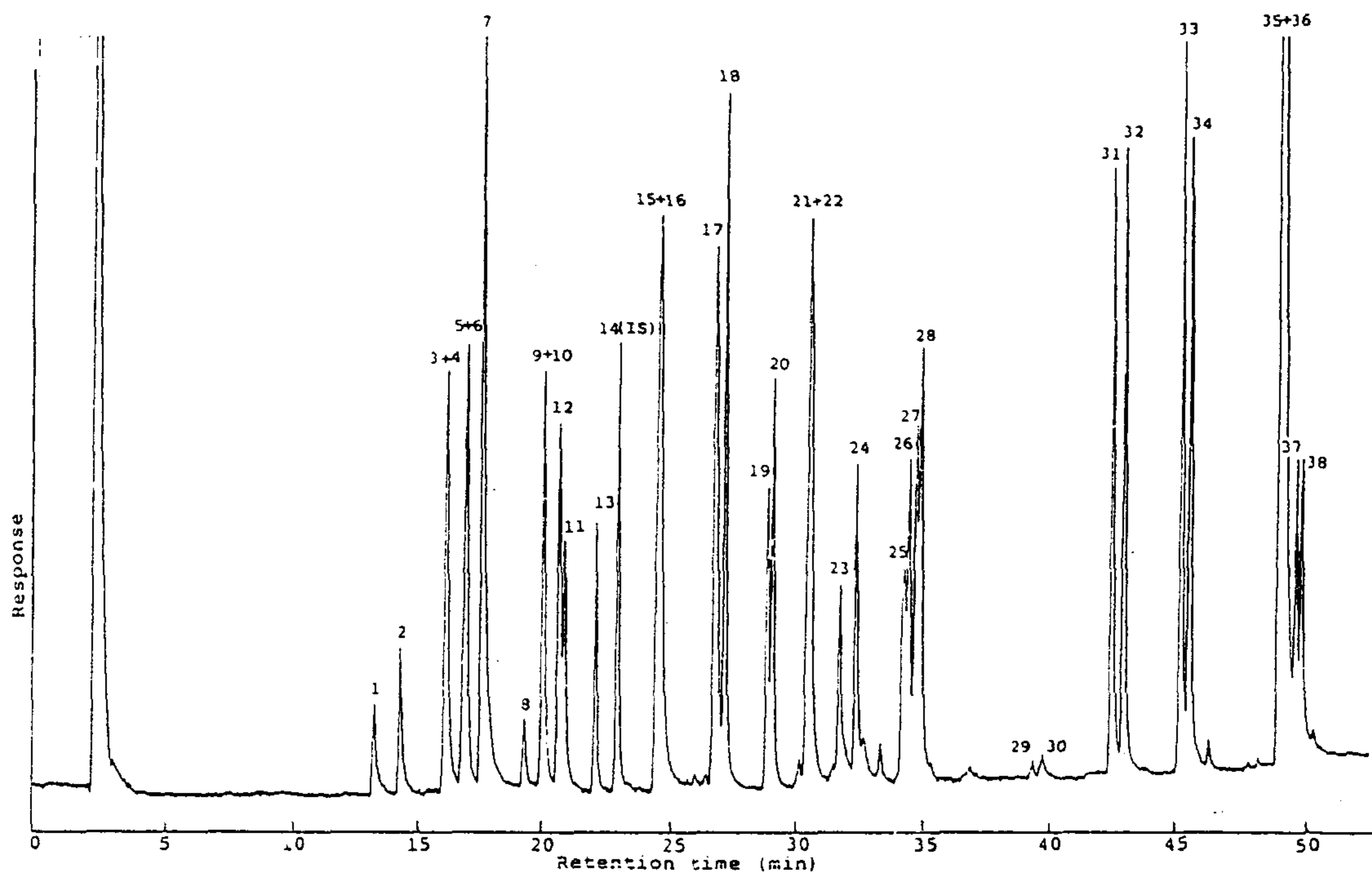


Figure 9. Chromatogram of TFA-IPA derivatives of d, l-Amino Acids mixture with TSD.
 Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 3. d-threonine, 4. d-valine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 8. d-isoleucine, 9. l-isoleucine, 10. d-serine, 11. d-leucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 15. d-proline, 16. l-proline, 17. d-cysteine, 18. l-cysteine, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 21. d-hydroxy proline(cis), 22. l-hydroxy proline(cis), 23. d-methionine, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 26. d-phenyl alanine, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 29. d-tyrosine, 30. l-tyrosine, 31. d-ornithine, 32. l-ornithine, 33. d-lysine, 34. l-lysine, 35. d-histidine, 36. l-histidine, 37. d-tryptophan, 38. l-tryptophan.

Table 5. Molar Response of Amino Acid with FID and NPD at GLC

(Unit : Area/ μ mole)

Amino Acid	Enantiomer	FID($\times 10^7$)	NPD($\times 10^7$)	NPD/FID
Alanine	l	2.50	7.5	3.00
Valine	d	2.93	8.00	2.73
	l	2.64	7.50	2.84
Threonine	d	2.73	5.30	1.94
	l	2.78	5.40	1.94
Glycine		1.86	29.4	15.8
Isoleucine	d	2.31	6.70	2.90
	l	2.64	8.00	3.03
Serine	d	2.07	16.9	8.16
	l	2.34	17.5	7.48
Leucine	d	4.20	16.2	3.86
	l	4.13	16.8	4.07
Proline	d	3.09	31.6	10.22
	l	3.48	34.7	9.97
Cysteine	d	5.15	58.7	11.40
	l	2.54	30.3	11.92
Aspartic Acid	d	4.06	22.1	5.44
	l	3.38	26.1	7.72
H. Proline (Cis)	d	3.50	28.7	8.20
	l	3.61	19.8	5.48
Methionine	d	2.12	22.8	10.75
	l	1.97	19.4	9.85
Glutamic Acid	d	3.93	23.4	5.95
	l	7.43	27.0	3.63
Phenylalanine	d	5.99	29.3	4.89
	l	2.38	32.8	13.78

Table 5. (continued)

Amino Acid	Enantiomer	FID	NPD	NPD/FID
Tyrosine	d	4.24	7.20	1.70
	l	4.10	4.60	1.12
Ornithine	d	3.13	52.4	16.74
	l	3.28	59.9	18.26
Lycine	d	3.33	46.3	13.90
	l	3.02	46.8	15.50
Histidine	d	2.20	64.1	29.14
	l	2.78	81.0	29.14
Tryptophan	d	2.19	33.1	15.11
	l	2.26	32.3	14.29
H. Proline (Trans)	l	2.03	44.1	21.72
Norleucine	l	4.23	14.1	3.33

고 있고 겹치는 것으로는 3.d-threonine과 4.d-valine, 9.l-isoleucine과 10.d-serine, 11. d-leucine과 12.l-isoleucine, 15.d-proline과 16.l-proline, 21,22.d,l-hydroxy proline, 27.l-glutamic acid와 28.l-phenyl alanine등은 잘 분리가 되지 않았다. 앞에서 언급한 바와같이 TSD를 사용할 때는 FID를 사용할 때와 chromatogram에 elution되는 순서도 동일 하였으나 tailing과 다양한 감도차이로 말미암아 FID처럼 유용하지 않았다.

6. 38종 아미노산의 A,B group의 분리

전체 38종 아미노산의 겹치는것과 분리능이 만족스럽지 못한 것이 있으므로해서 두 군으로 나누어 표준 아미노산의 chromatogram을 얻었다. GC/MS를 사용하여 겹치는 아미노산을 동시 정량할 수 있겠으나 편리한 방법은 아니기 때문에 우선 두 군으로 나누어 recovery등을 살펴 보려하였다. (Figure 10,11)

A군은 29종으로 구성되어 있고 d,l-alanine, d,l-valine, glycine, d,l-isoleucine, d,l-leucine, Norleucine (IS) d-proline, d,l-cystein, d,l-aspartic acid, d,l-hydroxy proline(cis), d,l-methionine, d,l-glutamic acid, l-phenyl alanine, d,l-tyrosine, d,l-ornithine, d,l-lysine, d,l-tryptophan이 속해 있다.

B군은 8종으로 되어있고 d,l-threonine, d,l-serine, l-norleucine (IS), l-proline, d-phenyl alanine, d,l-histidine이 속해있다.

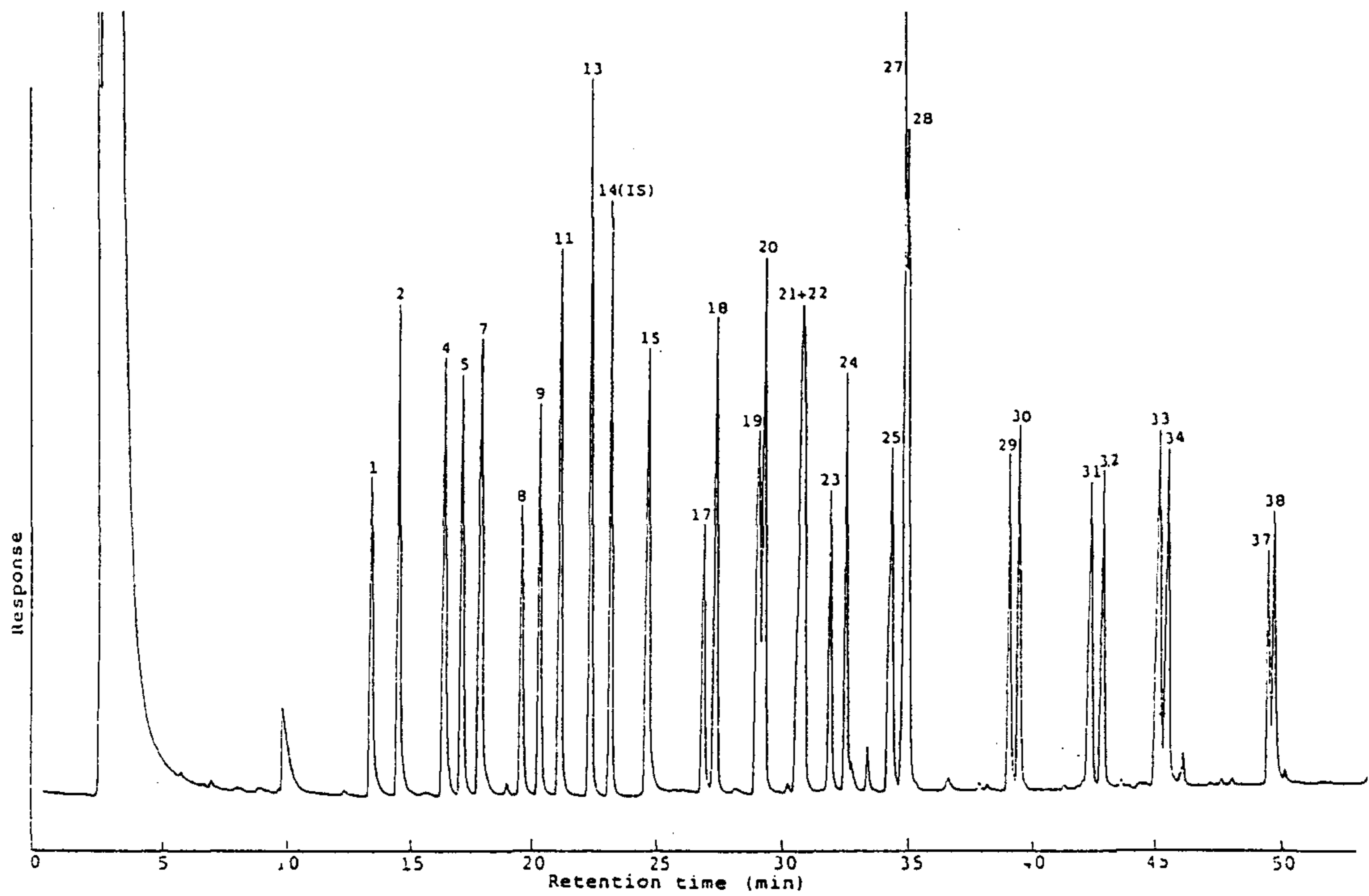


Figure 10. Chromatogram of standard A group of Amino Acids.

Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 4. d-valine, 5. l-valine, 7. glycine, 8. d-isoleucine, 9. l-isoleucine, 11. d-leucine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 15. d-proline, 17. d-cysteine, 18. l-cysteine, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 21. d-hydroxy proline(cis), 22. l-hydroxy proline(cis), 23. d-methionine, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 29. d-tyrosine, 30. l-tyrosine, 31. d-ornithine, 32. l-ornithine, 33. d-lysine, 34. l-lysine, 37. d-tryptophan, 38. l-tryptophan.

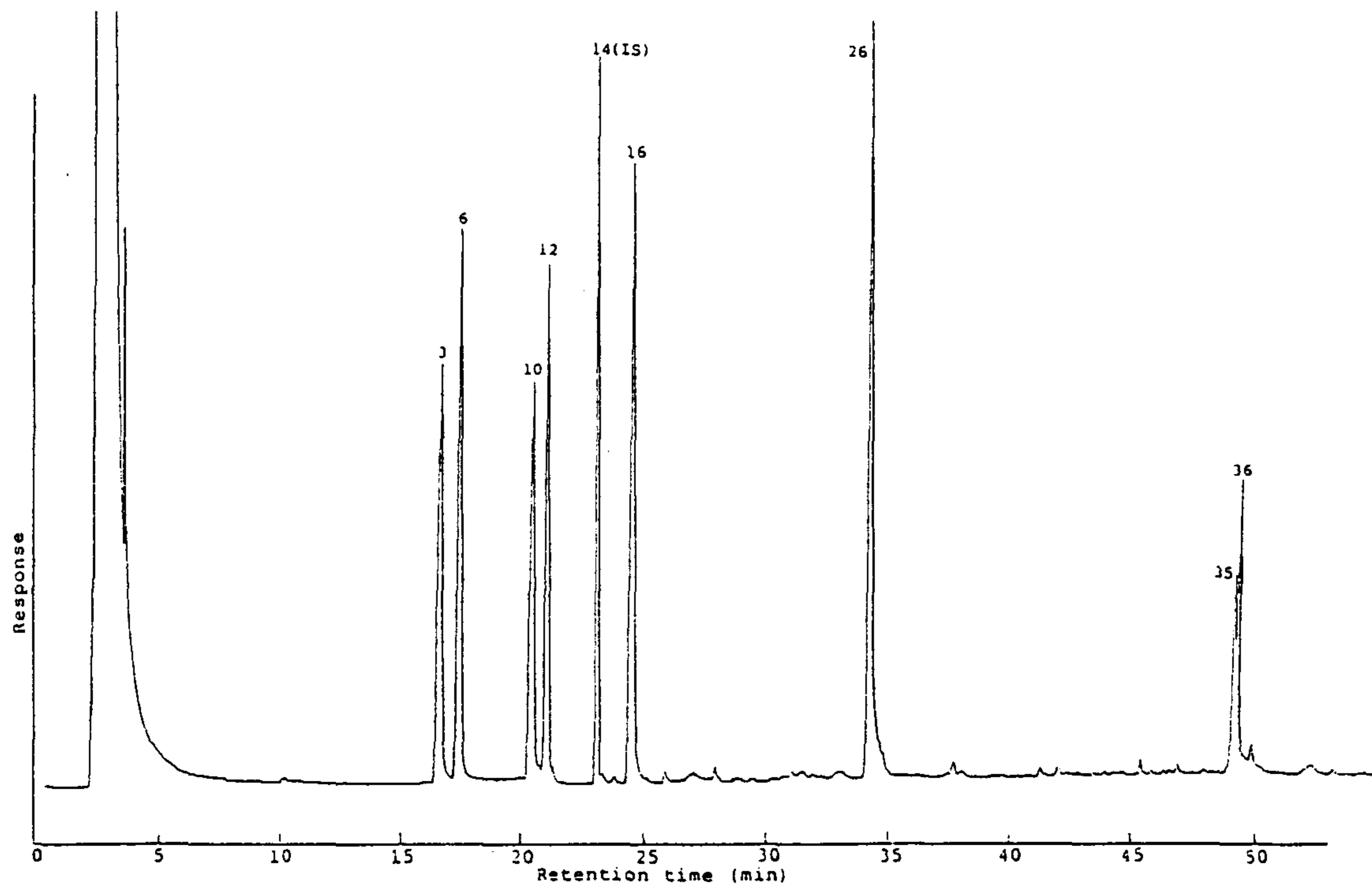


Figure 11. Chromatogram of standard B group of Amino Acids.
Peak Identity: 3. d-threonine, 6. l-threonine, 10. d-serine, 12. l-serine, 14. l-norleucine(IS),
16. l-proline, 26. d-phenyl alanine, 34. l-lysine, 35. d-histidine, 36. l-histidine,

7. l-form 아미노산의 이성화 기능 실험

만약 가수분해 조건에서 l-form이 d-form으로 이성화된다면 본 실험의 결과는 실용화하기가 무척 어려워진다. 이 점을 점검하기 위해 l-form의 alanine, valine, isoleucine, leucine, norleucine, cysteine, aspartic acid, methionine, glutamic acid, tyrosine, ornithine, lysine, histidine을 넣어서 단백질 가수분해 조건에서 (110°C) 24시간 방치한 다음 clean up과정을 거치고 유도체를 만들어서 이성화의 가능성을 점검하였다. (Figure 12) 단순한 산의 첨가와 가열함으로는 아미노산의 이성질화가 잘 되지 않음을 보여주었고, 일부 극미량의 d-aspartic acid (0.5% 이내)는 시료자체내의 불순물일 가능성이 대단히 높다. 따라서 본 연구에서 아미노산의 d-form 농도의 분석치는 신빙도가 있음이 판명되었다. 만약 산가수분해에 의해 이성질화가 형성된다면 alanine 및 glutamic acid도 일부 측정이 가능해야 되나, 측정이 되지 않는것으로 미루어 산가수분해 당시의 이성질화는 무시할 수 있다는 결론에 도달하였다.

8. 한국산 된장, 콩 중에서의 d,l-아미노산의 정량

Figure 13, 14, Table 6은 한국산 된장 중에서의 free AA와 단백질 중에서의 이성질체 아미노산을 측정한 것이다. 단백질 중에는 d-alanine, d-glutamic acid, d-aspartic acid, d-phenyl alanine만이 d-form이 존재하였고 마찬가지로 free AA에서도 네 종류의 아미노산만 d-form이 존재하였다. 그러나 현재로서는 왜 네 종류의 아미노산만이 d-form이 존재하는지는 확실하지 않다. 총 무게 함량에 따라

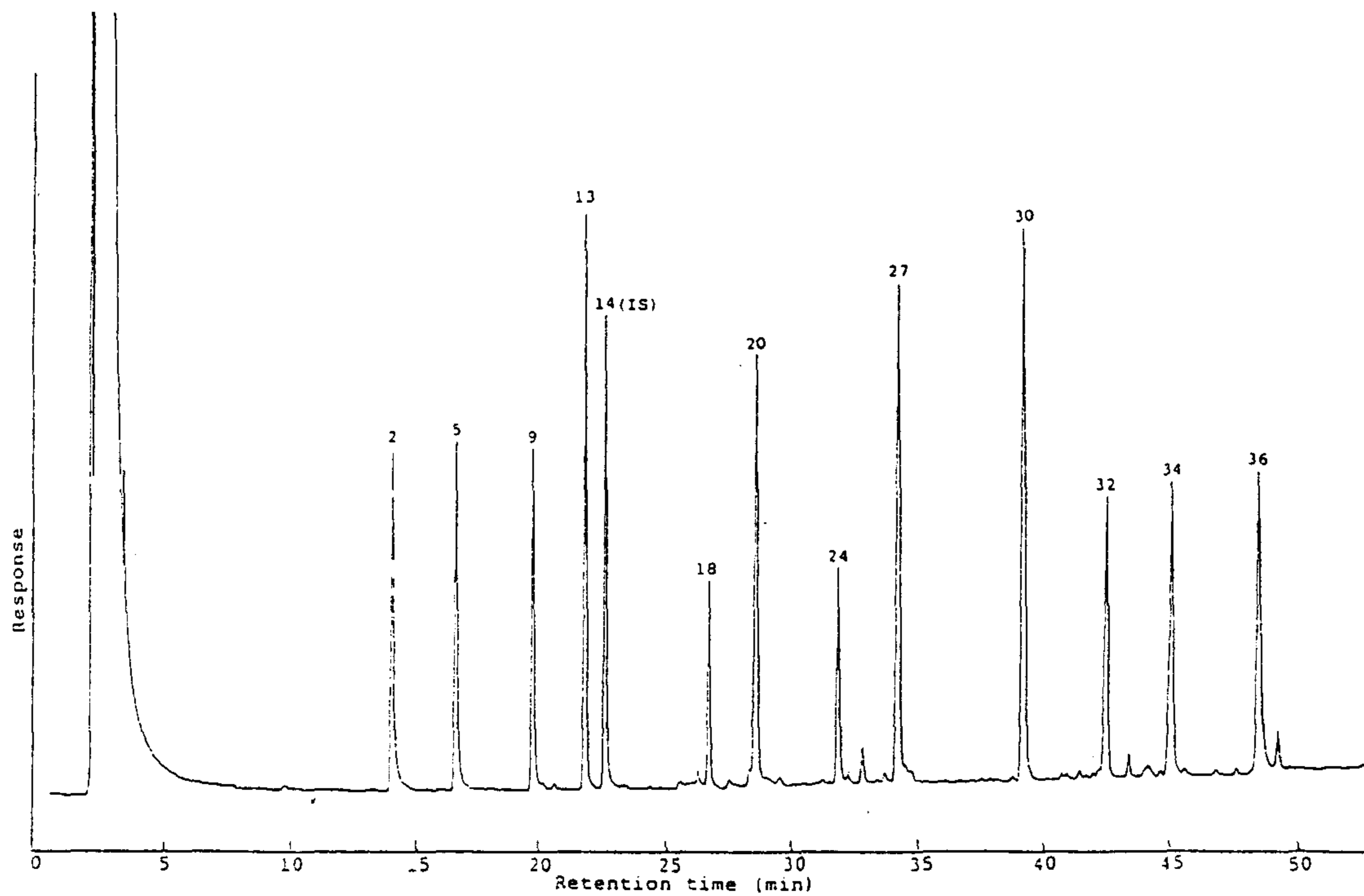


Figure 12. Standard L-form Amino Acids after hydrolysis and derivatization.
Peak Identity: 2. L-alanine, 5. L-valine, 9. L-isoleucine, 13. L-leucine, 14. L-norleucine (IS),
18. L-cysteine, 20. L-aspartic acid, 24. L-methionine, 27. L-glutamic acid, 30. L-tyrosine,
32. L-ornithine, 34. L-lysine, 36. L-histidine.

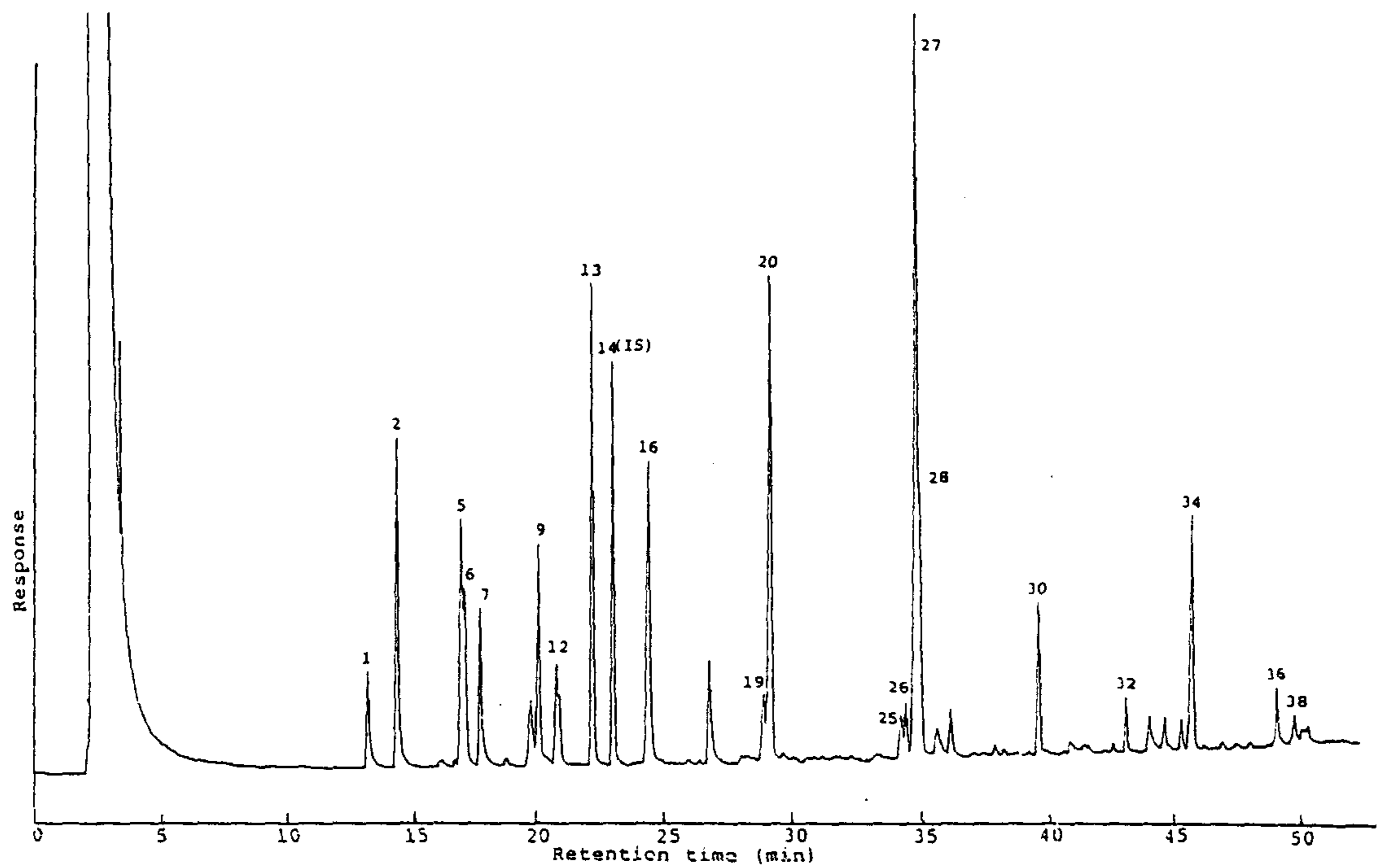


Figure 13. Chromatogram of free d,l-Amino Acids from Soypaste.

Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 25. d-glutamic acid, 26. d-phenyl alanine, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 32. l-ornithine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

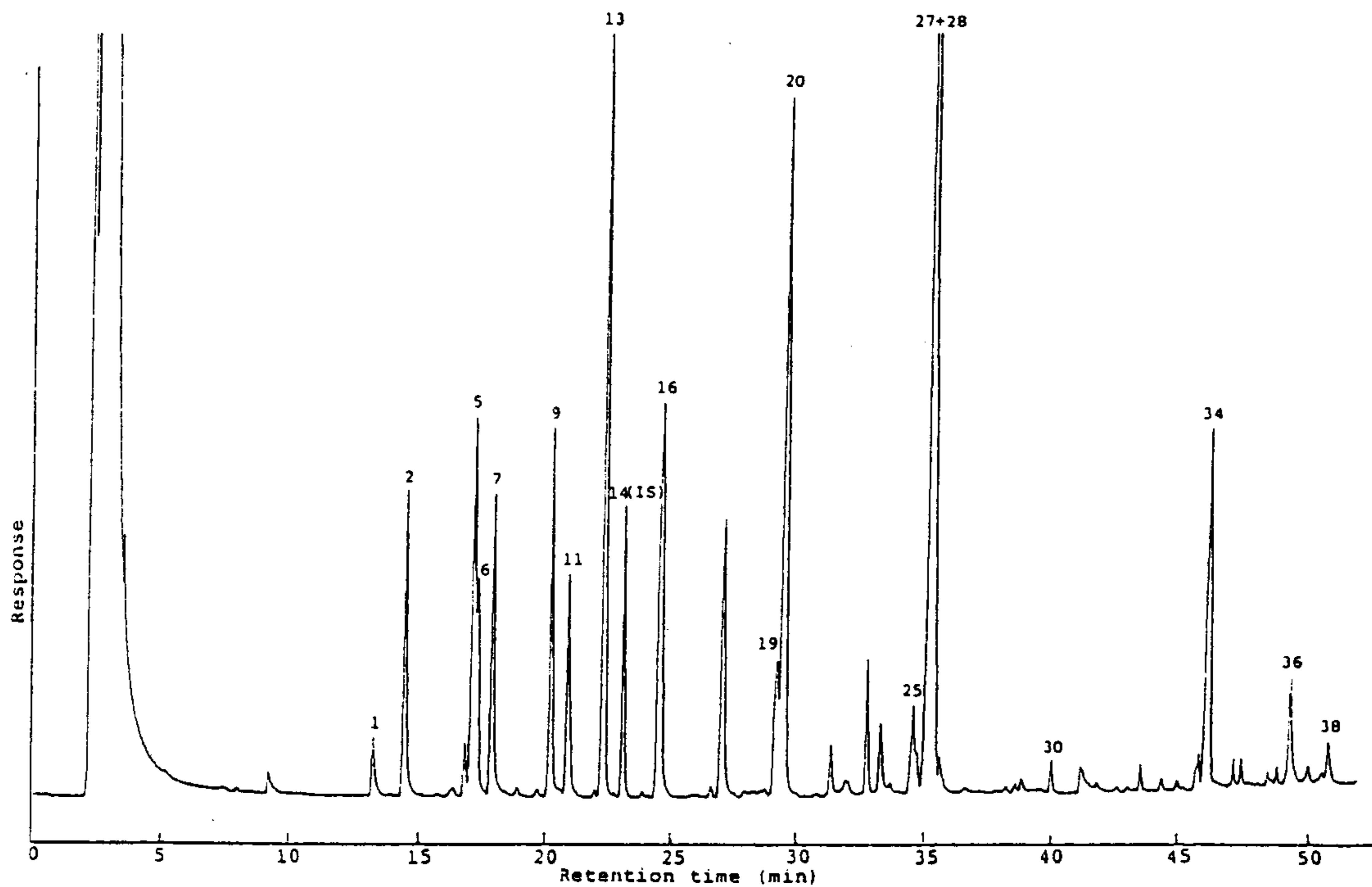


Figure 14. Chromatogram of d,l-Amino Acids from Soypaste.

Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 25. d-glutamic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

Table 6. Amino Acid Concentration of Soypaste fermented at different home & Soybean

Amino Acid	Enantiomer	Commercial Soypaste		Home-made Soypaste		Soybean
		I	II	I	II	
Alanine	d	0.04	0.03	0.41	0.14	0.01
	l	0.89	0.78	0.80	1.10	1.73
Valine	d	-	-	-	-	-
	l	1.55	1.05	2.57	1.73	2.87
Threonine	d	-	-	-	-	-
	l	0.62	0.55	0.65	0.57	0.90
Glycine		0.85	0.78	1.30	0.90	1.50
Isoleucine	d	-	-	-	-	-
	l	1.20	0.88	1.99	1.36	2.37
Serine	d	-	-	-	-	-
	l	0.71	0.30	0.78	0.77	1.46
Leucine	d	-	-	-	-	-
	l	1.62	1.54	2.53	1.76	3.36
Proline	d	-	-	-	-	-
	l	1.32	1.22	1.85	0.99	2.24
Aspartic Acid	d	0.20	0.21	0.51	0.25	0.16
	l	2.05	1.67	2.75	2.04	3.60
Glutamic Acid	d	0.17	0.16	0.23	0.15	0.14
	l	4.14	4.89	3.89	3.94	5.76
Phenyl Alanine	d	-	-	-	-	-
	l	1.01	1.10	1.69	1.15	2.14
Lysine	d	0.07	0.07	0.12	0.08	-
	l	0.42	0.16	1.35	1.56	2.41
Histidine	d	-	-	-	-	-
	l	0.38	0.42	0.67	0.56	0.99
Total		17.24	15.81	24.09	19.05	31.64
100DA/TA(%) ^a		3.0	3.0	6.0	3.0	1.0

a. DA:Sum of d-form amino acid, TA:total weight percent of amino acids.

서 d-form의 비율은 Table 6에 나와 있는 바와같이 판매용 된장은 3% 정도가 되는 반면 가정에서 숙성시킨 된장중에서는 3~6% 달하였고 콩에서는 다만 1% 가량 존재한다는 것을 알았다.

alanine과 aspartic acid의 이성질체 비율을 살펴보면 alanine에서는 d-form의 비율이 콩에서는 0.6%에 불과하지 않는데 비하여 판매용 된장에서는 4.5%, 3.8%, 가정에서 숙성된 된장에서는 51.3%, 12.7%에 달해서 숙성중 된장중에서의 racemization이 중요한 역할을 한다는 것을 짐작할 수 있다. aspartic acid에서도 비슷한 경향을 보이고 있고 콩에서는 4.4%에 지나지 않는데 비해 판매용 된장에서는 9.8%와 12.6%를 보여주고 있고 가정에서 숙성시킨 된장은 서로 이성질체의 비율이 18.5%와 12.3%를 나타내주고 있다. 따라서 현재까지의 결과로는 적은 양이 생체내에서 이성질화를 하지만 미생물에 의해 숙성될때 많은 양의 d-aspartic acid가 형성이 됨이 추측된다. Glutamic acid와 phenyl alanine은 서로 분리능이 만족하지 못하기 때문에 각자의 비율을 알아내기 어려웠고 이성질체의 비율이 aspartic acid의 약 삼분의 일 정도되는 점이 측정이 되었다.

9. 한국산 간장, 고추장에서 d,l-아미노산의 정량

Figure 15,16, Table 7은 한국산 간장과 고추장에서의 아미노산의 비율을 나타낸 chromatogram과 도표이다. 간장도 된장을 주원료로해서 만들어지기 때문에 된장에 포함되어 있는 d-form의 아미노산이 존재하며 aspartic acid의 경우 된장의 약 반정도의 비율을

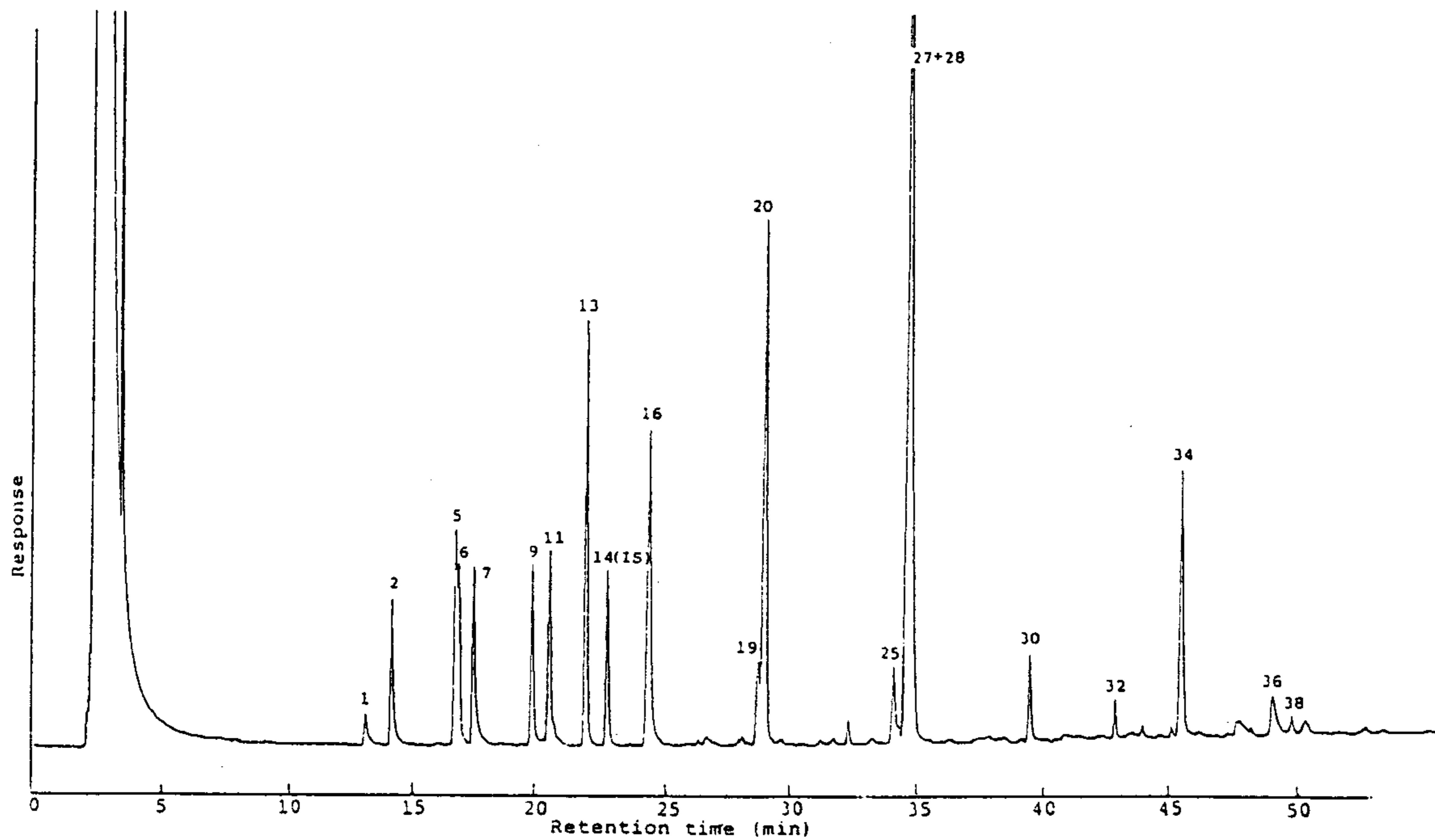


Figure 15. Chromatogram of d,l-Amino Acids from Soysauce.

Peak Identity: 1. d-alanine, 2. l-alanine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 25. d-glutamic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 32. l-ornithine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

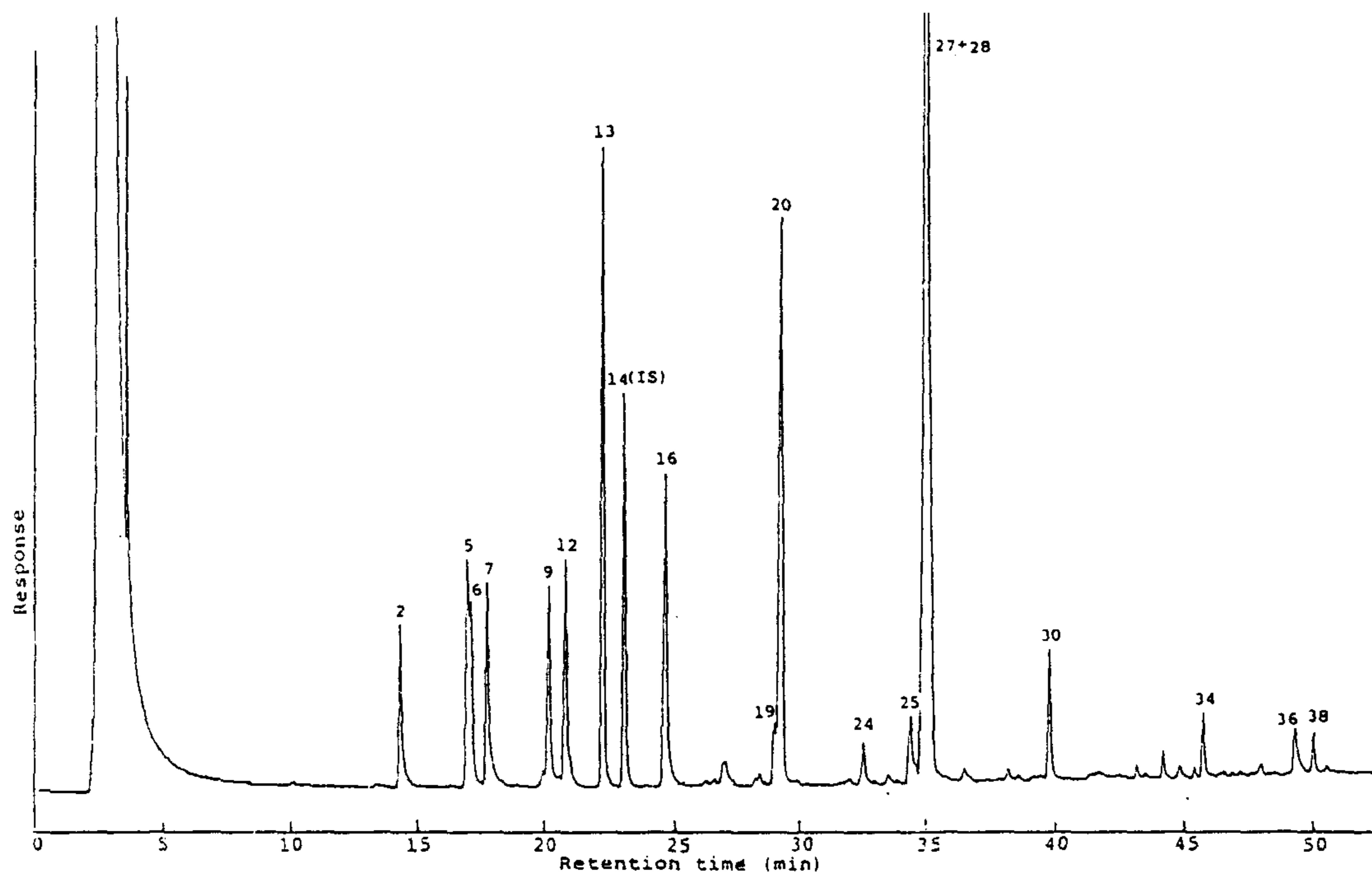


Figure 16. Chromatogram of d,l-Amino Acids from Korean Kochujang.

Peak Identity: 2. l-alanine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 24. l-methionine, 25. d-glutamic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

Table 7. Content of Amino Acid in Korean Soysauce and Traditional Kochujang

Amino Acid	Enantiomer	Soysauce	Kochujang	
			I	II
Alanine	d	0.03	-	-
	l	0.11	0.19	0.27
Valine	d	-	-	-
	l	0.20	0.33	0.46
Threonine	d	-	-	-
	l	0.15	0.22	0.31
Glycine	-	0.17	0.30	0.41
Isoleucine	d	-	-	-
	l	0.18	0.30	0.52
Serine	d	-	-	-
	l	0.19	0.34	0.42
Leucine	d	-	-	-
	l	0.26	0.61	0.78
Proline	d	-	-	-
	l	0.28	0.54	0.51
Aspartic Acid	d	0.07	0.07	0.07
	l	1.95	0.79	1.02
Glutamic Acid	d	0.07	0.11	0.08
	l	0.75	1.46	1.56
Tyrosine	d	-	-	-
	l	0.11	0.28	0.26
Lysine	d	-	-	-
	l	0.30	0.10	0.16

Table 7. (continued)

Amino Acid	Enantiomer	Soysauce	Kochujang	
			I	II
Histidine	d	-	-	-
	l	0.08	0.14	0.16
Total Amino Acid		4.90	5.78	6.99
Total d-form AA		0.17	0.18	0.15
Total l-form AA		4.73	5.60	6.84
D form ratio(%)		3.47	3.11	2.15

차지하고 있다.

고추장의 경우는 d-alanine이 보이지 않는게 특이하며 aspartic acid의 경우는 된장의 약 절반정도의 이성질체 비율, 8.9%와 6.9%를 나타내주고 있다. 간장과 고추장에서 d-form의 총비율은 약 3% 정도 나타내고 있다.

10. 백내장 시료중에서 d,l-아미노산의 정량

Figure 17, Table 8에서와 같이 백내장에서의 시료는 생화학적인 면이나 신체해부학적인 면에서 중요한 의미를 지님을 알 수 있고, 인체의 나이를 정량하는데 유용할 수 있다. d-glutamic acid나 d-phenyl alanine의 미량존재가 측정되긴 하지만 실험의 오차등으로 해서 정량에 문제가 있으나 d-aspartic acid는 다량 검출되므로 정량에 응용이 충분하다. d-alanine은 식물체내에서와 달리 유제품이나 치아, 백내장등 동물성 시료에서는 검출할 수 없었다. 대략적인 방법으로 나이와 백내장에서의 d-aspartic acid의 이성화에 대한 비율을 계산하여 보면 1년에 0.15~0.25%의 l-aspartic acid가 d-form으로 변화되고 있음을 추정할 수 있었다. 정량적으로는 단백질 총량에 있어서 loss가 약 20%~30%정도 있음을 예측할 수 있고 기술향상으로 이 문제는 극복할 수 있을 것이나 Tryptophan, Histidine, Cystein, Arginine등 가수분해 및 유도체 도중 깨지는 아미노산으로 인해 GC의 단일 측정 방법으로는 10%정도의 손실은 어쩔 수 없다. 다만 d,l의 비율을 비교할 때는 별문제가 없으리라 예측하지만 동일한 비율로 파괴가 되지 않을 경우에는 정확한 비

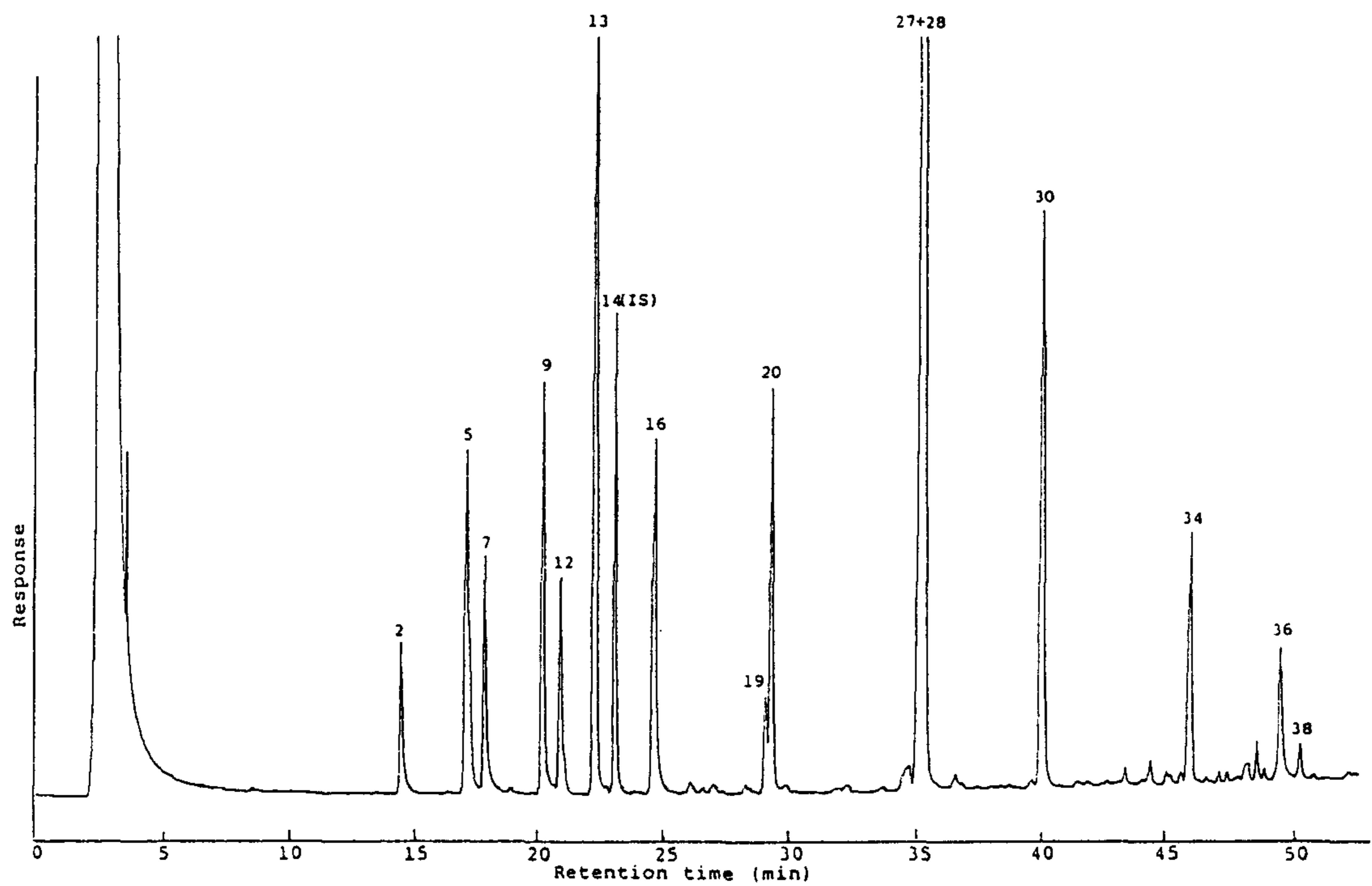


Figure 17. Chromatogram of d,l-Amino Acids from Cataract.

Peak Identity: 2. l-alanine, 5. l-valine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

Table 8. Analysis of Amino Acids from Cataract

Amino Acid	Enantiomer	Name of Patient							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Alanine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.49	0.28	0.32	0.34	0.26	0.40	0.48	0.42
Valine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.38	1.06	1.27	1.01	1.27	1.45	1.43	1.42
Threonine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.28	-	-	0.27	0.32	-	-	-
Glycine		0.84	0.50	0.63	0.65	0.77	0.70	0.67	0.69
Isoleucine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.49	1.05	1.21	1.24	1.28	1.32	1.21	1.24
Serine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.82	0.53	0.62	0.63	0.71	0.75	0.59	2.68
Leucine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	2.12	1.62	1.86	1.75	1.92	1.74	1.68	1.76
Proline	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.09	0.73	0.92	0.92	0.99	0.95	0.82	0.90
Cysteine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.19	0.24	0.16	0.19	0.20	0.14	0.23	0.18
Aspartic Acid	d	0.22	0.17	0.16	0.19	0.22	0.16	0.19	0.18
	l	1.23	0.71	1.00	0.98	1.11	1.12	0.83	1.00
Glutamic Acid	d	0.13	-	0.09	0.09	0.09	-	0.08	0.10
	l	3.38	2.89	3.76	2.75	2.96	4.33	2.41	3.46
Tyrosine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	3.38	2.23	3.05	2.18	1.95	2.64	1.82	2.37
Lysine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.32	0.69	1.03	0.99	1.00	1.10	0.73	1.08

Table 8. (continued)

Amino Acid Enantiomer		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Histidine	d	-	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.89	0.47	0.63	0.70	0.67	0.70	0.50	0.72
Total-form Amino Acid		19.33	13.08	16.80	14.95	15.67	17.86	13.67	16.23
d-form Amino Acid		0.35	0.17	0.25	0.28	0.31	0.16	0.27	0.28
l-form Amino Acid		18.98	12.91	16.55	14.67	15.16	17.70	13.40	15.95
100DA/TA(%)		1.81	1.30	1.49	1.87	1.98	0.90	1.98	1.73

을 얻는데 문제가 없는것은 아니다. 그러나 aspartic acid나 glutamic acid는 산존재하에서 안정하기 때문에 가수분해로 인한 오차는 배제할 수 있고 다만 내부표준물질과의 비교에서 오는 정량에 있어서 오차를 줄이도록 노력하면 정확한 분석치를 얻을 수 있다. d-form의 전체 아미노산에 대한 비율을 대략 1~2%에 지나지 않지만 대부분 aspartic acid에서만 d-form이 나타나기 때문에 정확히 환자의 나이를 구별하는데 사용할 수 있고 앞으로 연구에 따라서 다양하게 임상적으로 응용이 가능하다.

11. 분유중에서의 광학이성질 아미노산의 정량

식품중의 d-form은 보통 영양가에는 계산이 되지만 실제 사용할 수 없는 부분이기 때문에 정확한 영양가를 알기 위해서는 광학이성질체의 분석도 아울러 수행되어야 한다. 생체내에서 합성되는 단백질은 모두 l-form의 아미노산으로 구성되어있고 d-form은 아무리 많이 존재한들 이용할수가 없기 때문에 자연히 체외로 배출되어 쓸모 없는 것들이다. 따라서 d-form이 얼마나 많이 존재하는지는 식품의 유용도를 알기 위해 대단히 관심이 있는 부분이고 특히 분유는 저온살균과 고온살균의 정도에 따라서 단백질에 대한 변성유무에 많은 중요성이 존재하고 있다. 결론적으로 고온살균분유인 I, II, III과 저온살균분유인 IV, V를 비교하였을 때 d-form으로 되는 racemization되는 정도는 고온살균에서 무시할 정도이었다. 그러나 이런 방법을 이용하여 고온살균할때 단백질의 변성정도, 즉 자연성을 상실한다던지 칼슘과 카제인네이트와 결합성, 물에서의

용해도등은 예측할 수 없었다.

분유에 존재하는 d-form은 주로 적은양의 aspartic acid glutamic acid 또 미량의 phenylalanine이었으며 우유는 체세포처럼 생성된지 오래되지 않고 신선하게 소에서부터 얻어지기 때문에 판시료에서 보다 적은 양이 검출되었다. 본 연구에서는 수행되지 않았으나 요쿠르트나 치즈등에 섞여있는 단백질중 d-form은 우유에서 보다 훨씬 많으리라 예측된다. Aspartic acid의 경우 d-form의 비율은 고온살균우유인 I, II, III이 5.0%, 4.8%, 5.3%를 나타내주고있고 저온살균 우유인 IV, V가 4.2%, 2.9%를 얻었다. Glutamic acid의 경우도 대략 비슷하여 I, II, III이 4.4%, 4.2%, 4.0% IV, V가 3.8%, 3.8%의 비율을 나타내었다. 따라서 고온살균에 의한 이성질체의 변환은 별로 크게 작용되지 않음이 밝혀졌다. (Figure 18, Table 9) 따라서 d-form이 중요한 역할을 담당하지 않는 아미노산은 Table 10에 나와있는 바와같이 산해리상수의 차이를 이용하여 ion exchange chromatography 방법으로 pH와 ionic strength의 차이를 주어 분리하는 방법을 사용하고 있다.

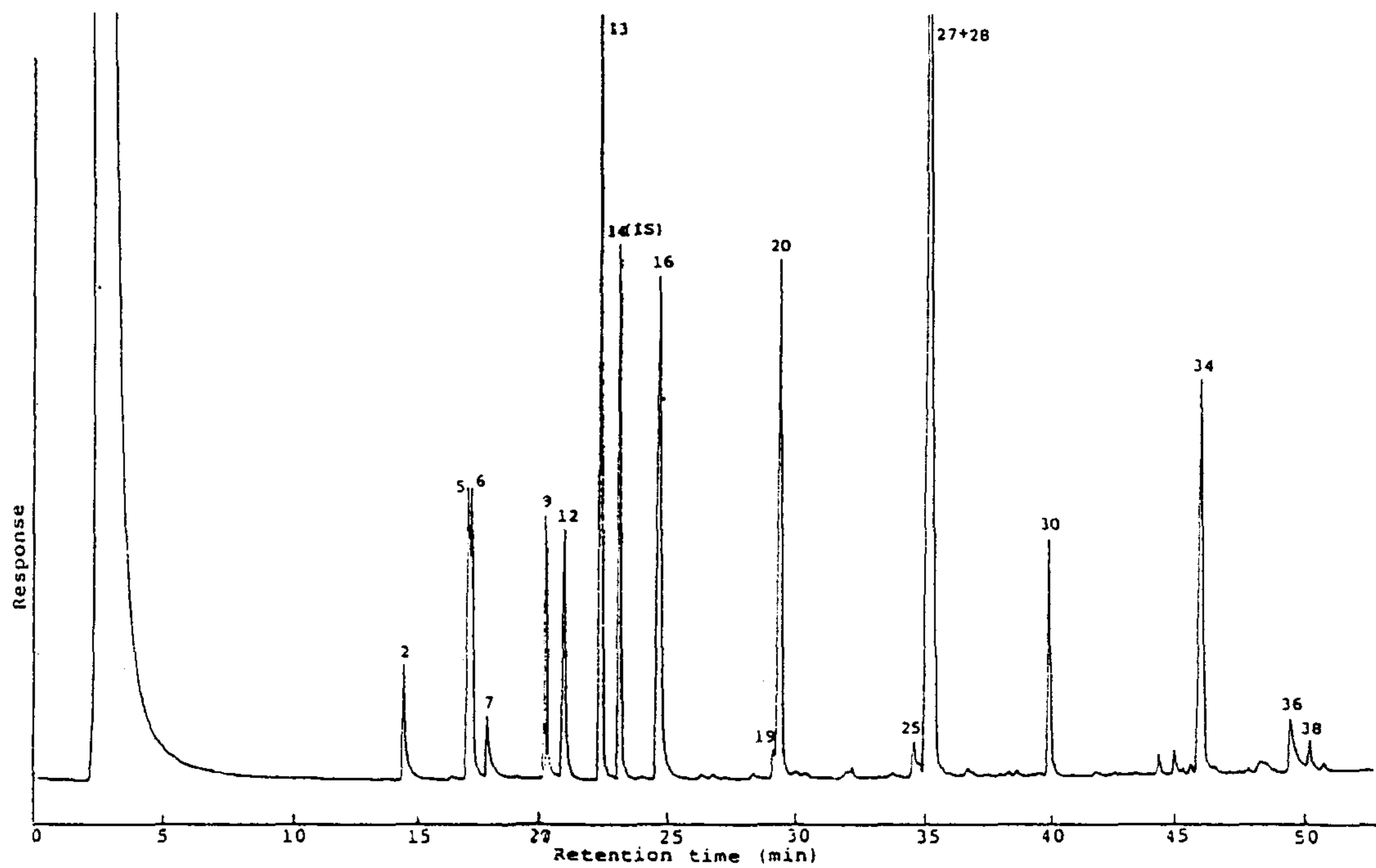


Figure 18. Chromatogram of d,l-Amino Acids from Powdered Milk.

Peak Identity: 2. l-alanine, 5. l-valine, 6. l-threonine, 7. glycine, 9. l-isoleucine, 12. l-serine, 13. l-leucine, 14. l-norleucine(IS), 16. l-proline, 19. d-aspartic acid, 20. l-aspartic acid, 25. d-glutamic acid, 27. l-glutamic acid, 28. l-phenyl alanine, 30. l-tyrosine, 34. l-lysine, 36. l-histidine, 38. l-tryptophan.

Table 9. Content of Amino Acids in Powdered Milk (Unit : Wt %)

Amino Acid	Enantiomer	Producer of Powdered Milk				
		I	II	III	IV	V
Alanine	d	-	-	-	-	-
	l	0.34	0.43	0.31	0.33	0.22
Valine	d	-	-	-	-	-
	l	0.85	1.17	0.82	0.74	0.60
Threonine	d	-	-	-	-	-
	l	0.53	0.62	0.49	0.47	0.57
Glycine		0.20	0.27	0.18	0.17	0.15
Isoleucine	d	-	-	-	-	-
	l	0.75	0.94	0.71	0.64	0.58
Serine	d	-	-	-	-	-
	l	0.62	0.86	0.60	0.55	0.62
Leucine	d	-	-	-	-	-
	l	1.34	1.69	1.27	1.12	1.27
Proline	d	-	-	-	-	-
	l	1.18	1.65	1.07	0.89	1.06
Aspartic Acid	d	0.05	0.06	0.05	0.04	0.04
	l	1.00	1.26	0.95	0.95	1.38
Glutamic Acid	d	0.10	0.12	0.08	0.07	0.08
	l	2.26	2.86	2.02	1.82	2.09
Tyrosine	d	-	-	-	-	-
	l	0.53	0.76	0.50	0.38	0.50
Lysine	d	0.03	0.03	0.02	-	0.02
	l	1.34	1.56	1.07	1.15	1.56

Table 9. (continued)

Amino Acid	Enantiomer	I	II	III	IV	V
Histidine	d	-	-	-	-	-
	l	0.27	0.36	0.20	0.23	0.26
Total Amino Acid		11.58	14.82	10.51	9.74	11.00
Total d-form AA		0.18	0.21	0.15	0.11	0.14
Total l-form AA		11.40	14.61	10.36	9.63	10.86
d-form Ratio(%)		1.55	1.42	1.43	1.13	1.27

Table 10. pK values for the ionizing groups of some amino acids.

Amino Acid	pK ₁ -COOH	pK ₂ -NH ₂	pK _r -R GROUP
Glycine	2.34	9.60	
Alanine	2.34	9.69	
Leucine	2.36	9.60	
Serine	2.21	9.15	
Threonine	2.63	10.43	
Glutamine	2.17	9.13	
Aspartic Acid	2.09	9.82	3.86
Glutamic Acid	2.19	9.67	4.25
Histidine	1.82	9.17	6.00
Cysteine	1.71	10.78	8.33
Tyrosine	2.20	9.11	10.07
Lysine	2.18	8.95	10.53
Arginine	2.17	9.04	12.48

제 4 장 결 론

광학이성질체 분리 연구의 제1차년도 연구로서 GC의 chiral column을 사용하여 아미노산의 광학이성질체를 분리하였으며 유도체의 효용도로서 TFA, PFP, HFB를 사용하여 acylation을 하였을 때 TFA가 제일좋은 분리능과 안정도를 유지하였다. column에 retain되는 순서를 보면 amine기에 hydrocarbon기가 있는 Histidine, Lysine이 제일 많이 상호작용이 있었고, phenyl group과 alkyl group이 있는것이 다음으로 작용하였으며, 다음은 carboxyl기가 있는 것, 긴 탄화수소기가 있는것, 짧은 탄화수소가 있는 것 순으로 소수성 작용이 감소하였다.

Racemization이 일어나는 아미노산은 Alanine, Aspartic acid, Glutamic acid, phenyl alanine이었으며 된장등 식물성 시료는 d-alanine을 검출할 수 있었으나 분유, 백내장등 동물성 시료에서는 검출되지 않았다. D-form의 비율은 된장이 3~6% 또 간장이 2~4%, 콩이 약 1%, 백내장이 1~2%, 또 분유내에서 1.0~1.5%로 검출되었으며 미생물 발효시 광학이성질체의 변환이 현저함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Stig G. Allen mark, "Chromatographic Enantioseparation," 1st ed John Wiley & Sons, 1988.
2. A. Holt ; A.W. Javie ; G.J. Jerris, Tetrahedron Letters, 1968, 4087.
3. S. Mitsui ; Y. Kudo, Tetrahedron, 1967, 23, 4271.
4. G. Blaschke, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1980, 13.
5. C.H. Lochmuller ; R.W. Souter, J. Chromatogr., 1975, 113, 283.
6. G.M. Janini ; D.E. Martire ; J. Chem. Soc. Faraday II, 1974, 70, 837.
7. N. Nimura ; T. Suzuki ; Y. Kasahara ; T. Kinoshita, Anal. Chem., 1981, 53, 1380-1383.
8. W.F. Lindner ; I.Hirschbock, J. of Liq. Chromatogr., 1986, 9(243), 551-571.
9. H. Kuniwa ; Y. Baba ; T. Ishida ; H. Katoh, J. of Chromatogr., 1989, 461, 397-405.
10. E. Armani ; L. Barazzoni ; A. Dossena ; R. Marchelli, J. of Chromatogr., 1988, 441, 287-298.
11. B. Feibush ; M. J. Karger ; J. of Chromatogr., 1983, 282, 3-26.
12. W. Lindner ; J. N. Lepage ; G. Davies ; D. E. Seitz ; B.L. Karger, J. of Chromatogr., 1979, 185, 323-344.

13. T. Takeuch ; H. Asai ; D. Ishii, J. of Chromatogr., 1986, 357, 409–415.
14. C. Gilson ; R. Leshem ; E. Grushka, Anal.Chem., 1980, 52, 1206–1209.
15. S. Lam, J. of Chromatogr., 1986, 355, 157–164.
16. W. H. Pirkle ; D.W. House ; J.M. Finn, J. of Chromatogr., 1980, 192, 143–158.
17. Myung Ho Hyun, J. of Chromatography, 1987, 393, 357–365.
18. Shoji Hara ; Akira Dobashi, J. of Chromatography, 1979, 186, 543–552.
19. W.H. Pirkle ; M.H. Hyun ; Bernadine Bank, J. of Chromatography, 1984, 361, 585–604.
20. W.H. Pirkle ; T.C. Pochapshy ; G.S. Mahler ; Richard E. Field, J. of Chromatography, 1985, 348, 89–96.
21. J. Yamashita ; T. Numakura ; H. Kita ; J. Suzuki ; S. Oi ; S. Miyano ; H. Hashimoto, J. of Chromatography, 1987, 403, 275–279.
22. P. Salvadori ; D. Pini ; C. Rosini ; G. Uccello-Barretta ; C. Bertucci, J. of Chromatography, 1988, 450, 163–168.
23. W.H. Pirkle ; J.M. Finn, J. Org. Chem, 1981, 46, 2935–2938.
24. Heinz Berndt ; Gotz Kruger, J. of Chromatography, 1985, 348, 275–279.
25. J. Debowski ; Danuta Sybilska, J. of Chromatography, 1982, 237, 303–306.

26. E. Smolkova – Keulemansova, J. of Chromatography, 1982, 251, 17–34.
27. Daniel W. Armstrong, J. of Chromatography, 1984, 7(S-2), 353–376.
28. A. Alak ; E. Heilweil ; W.L. Hinze ; H.Oh ; D.W. Armstrong, J. of Liquid Chromatography, 1984, 7(7), 1273–1288.
29. T.J. Ward ; D.W. Armstrong, J. of Liquid Chromatography, 1986, 9(2 & 3), 407–423.
30. D.W. Armstrong ; W. Demond, J. of Chromatographic Science, 1984, 22.
31. C.D. Tran ; J.H. Fendler, J. Phys. Chem, 1984, 88, 2167–2173.
32. Prof. Dr-Ing ; W.Saenger, Angew.Chem. Ed. Engl, 1980, 19, 344–362.
33. Daniel W. Armstrong ; Timothy J. Ward ; R.D. Armstrong ; T.E. Beesley, 232.
34. R.P. Rohrbach ; L.J. Rodriguez ; E.M. Eyring ; J.F. Wojcik, The Journal of Physical Chemistry, 1977, 81.
35. Marian Mikolajczyk ; Jozef Drabowicz, J. of the American Chemical Society, 1978, 100, 8.
36. Yoshio Inoue ; T. Okuda ; Y. Miyata, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 7393–7394
37. S. Allenmark ; B. Bomgren, J. Chromatogr., 1982, 252, 297
38. K.R. Lindner, J. Chromatogr., 1980, 193, 308–310

39. S. Hara ; A. Dobashi ; K. Kinoshita, J. Chromatogr., 1986, 371, 153–158.
40. A. Dobashi ; Y. Dobashi ; Tamami Oho ; Shoji Hara, J. Chromatogr., 1989, 461, 121–127.
41. K.R. Leimer ; R.H. Rice ; C.W. Gehrke, J. Chromatogr., 1977, 141, 355.
42. F.W. McLafferty ; E.R. Lory ; J. Chromatogr., 1981, 203, 109.
43. N. Oi ; M. Horiba ; H. Kitahara, J. of Chromatogr., 1980, 202, 299–301.
44. I. Abe ; K. Izumi ; S. Kuramota ; S. Musha, J. of HRC & CC, 1981, 4, 549–553.
45. N.E. Blair ; W.A. Bonner, J. of Chromatogr., 1980, 198, 185–187.
46. H. Frank ; A. Rettenmeier ; H. Weiker ; G. J. Nicholson ; E. Bayer, Anal. chem., 1982, 54, 715–719.
47. B. Grego ; M.T. W. Hearn, J. Chromatogr., 1983, 255, 67.
48. B.R. Larsen ; F.G. West, J. Chromatogr. Sci., 1981, 19, 257.
49. H. Umagat ; P. Kucera ; L.F. Wen, J. Chromatogr., 1982, 239, 463.
50. R.L. Heinrickson ; S.C. Meredith, Anal. Biochem., 1984, 136, 65.
51. J.R. Spies, Anal. Chem., 1967, 39, 1412.
52. F.E. Kaiser ; C.W.Gehrke ; R.W.Zumwalt ; K.C. Kuo, J. Chromatography, 1974, 94, 113.

53. D. Lahadarios ; I.M. Moodie ; G.S. Shepard, J. Chromatogr., 1984, 310, 223.
54. M. Makita ; S. Yamamoto ; S. Kiyama, J. Chromatogr., 1982, 237, 279.
55. S. Lahadarios ; R.A. Landowne, Tetrahedron, 1966, 3085.
56. B. Halpern ; J.W. Westley, Chem. Commun., 1966, 34.
57. C.J.W. Brooks ; M.T.Gilbert ; J. Gilbert, Anal. Chem., 1973, 45, 896.
58. B. Halpern., ; J.W. Westley, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 19, 361.
59. J.W. Westley ; B. Halpern, Anal. Chem., 1968, 40, 2046.
60. R.W. Souter, J. Chromatogr., 1975, 108, 265.
61. B.L. Karger ; R.L. Stern ; W. Keane, Anal. Chem., 1967, 39, 228.
62. J.A. Dale ; D.L. Dull ; H.S. Mosher, J. Org. Chem., 1969, 34, 2543
63. J. Gal ; M.M. Ames, Anal. Biochem., 1977, 83, 266.
64. J.W. Westley ; B.Halpern, J. Org. Chem., 1968, 33, 3978.
65. S. Hammarstrom ; M. Hamberg, Anal. Biochem., 1973, 52, 169.
66. J.D. Gilbert ; C.J.W. Brooks, Anal. Lett., 1973, 6, 639.
67. E. Gil-Ar. ; R. Charles ; G. Fisher, J. Chromatogr., 1965, 17, 408.
68. S. Julia ; J.M. Sans, J. Chromatography Sci., 1979, 17, 651.
69. J.P. Kamerling ; M. Duran, J. Chromatogr., 1981, 222, 276.
70. B. Halpern ; L.F. Chew ; J.W. Westly, Anal. Chem., 1967, 39,

399.

71. A.R. Mitchell ; S.B.H. Kent ; I.C. Chu ; R.B. Merrifield, Anal. Chem., 1978, 50, 637.
72. E.P. Kroeff ; D.J. Pietrzyk, Anal. Chem., 1978, 50, 1053.
73. E. Lundanes ; T. Geibrokk, J. Chromatogr., 1978, 149, 214.
74. J. Hermansson ; C. von Bahr, J. Chromatogr., 1980, 221, 109.
75. J. Goto ; M. Hasegawa ; S. Nakamura ; K. Shimada ; T. Nambara, J. Chromatogr., 1978, 152, 413.
76. P. Loew ; W.S. Johnson, JACS, 1971, 93, 3765.
77. M. Koreeda ; G. Weiss ; S. Nakanishi, JACS, 1973, 95, 239.
78. C.G. Scott ; M.J. Petrin ; T. Mccorcle, J. Chromatogr., 1976, 125, 157.
79. B.J. Bergot ; R.J. Anderson ; D.A. Schooley ; C.A. Henrick, J. Chromatogr., 1978, 155, 97.