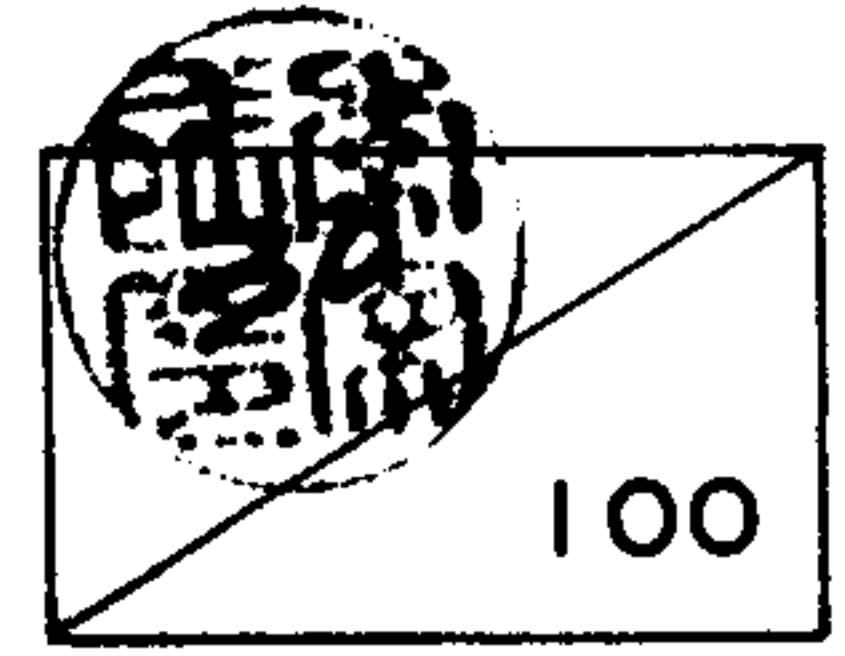


제 3 차 년 도
최 종 보 고 서



특수물질의 분리, 분석 및 해석기법 연구

A Study on the Separation, Analysis or
Interpretation of Valuable Material

광학이성질체의 분리에 관한 연구

A Study on the Separation of Optical Isomer

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 "특정물질의 분리, 분석 및 해석기법"의 세부과제인 "광학이성질체의 분리에 관한 연구" 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992. 7.

주관연구기관명 : 한국 과학 기술 연구원

연구부서명 : 특성 분석 센터

총괄연구책임자 : 김택제(특성분석센터 책임연구원)

연구책임자 : 이재성(특성분석센터 선임연구원)

연구원 : 조동희(특성분석센터 연구원)

홍종기(특성분석센터 연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

광학이성질체의 분리에 관한 연구(3차)

II. 연구의 목적 및 중요성

광학이성질체는 의약합성중 상호존재하고 있는 경우가 많고 천연물 질중 아미노산은 자연적으로 이성화도하여 체내조화에 중요한 역할을 한다 따라서 의약의 정확한 효능을 연구하거나 광학이성질체의 생화학적 반응을 연구하기 위하여 이것의 분리가 중요성을 가진다. 이미 선진국에서 규제가 시작되고 있고 이성질체 의약의 함량분석법에 대처하고 제조과정에 도움이 되고자 본연구를 추진하였다.

단백질에서 아미노산의 분리과정중 이성화되는 메카니즘에 대해 검토해 보고, LC를 이용한 분리과정 중 제일 좋은 편이성을 지닌 cyclodextrin bonded phase를 합성하여 이의 효능을 살펴 보았다.

III. 연구의 내용 및 범위

HPLC에서 cyclodextrin bonded phase를 합성하여 Dansyl amino acid의 분리를 시도하였고 cyclodextrin과 d,l-form으로 아미노산간의 inclusion complex 형성도를 비교해서 분리되는 과정을 추적하려 시도하였다.

IV. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. d,l-phenyl alanine과 o,m,p-nitroaniline을 대상으로 실험하여 본 결과 C18 column 보다 β -cyclodextrin bonded phase가 이성질체 분리에 우수한 효능이 있음이 증명되었다.

2. Bulky한 몇 종류의 광학이성질체의 약품분리는 cyclodextrin column도 별로 좋은 분리능을 보여주지는 못하였으나 앞으로 발전시켜 많은 응용을 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

3. Dansyl amino acid의 이성질체분리는 β -cyclodextrin을사용하였을 경우 leucine, novaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid가 분리가 되었다.

4. Inclusion complex의 정도를 Dansyl-amino acid로 비교하여 본 결과 d-form 이 β -cyclodextrin에서 먼저 elution되어 GC에서와 반대의 geometry를 이루었다.

V. 계획과 실적의 대비표

----- 당초계획
 _____ 진 도

구분 연구내용	'91 8	9	10	11	12	'92 1	2	3	4	5	6	7	진도 (율)
1. 자료수집정리			▶										5
2. 시약구입정제				▶									10
3. 고정상의 합성										▶			70
4. LC에서의 분리 과정 연구												▶	10
5. 보고서 작성												▶	5
총 진 도 율	5	5	10	10	10	5	10	10	10	5	10	10	100

여 백

Summary

I. Title

"A Study on the Separation of Optical Isomer"
(The Third Report)

II. The Purpose and Importance of the Project

Most enantiomers in synthetic drugs are existed as racemic mixture. Especially natural products such as amino acids are racemized spantaneously in the course of the degradation process in biological system. Therefore its importance of separation comes from demands on study for exact effect of synthetic drugs as well as the reactivity of enantiomers in biological fluid. Not only for preparation on restrictions from advanced country about enantiomeric drugs but also for providing information on manufacturing process, this study should be investigated for many years. For better understanding of enantiomeric separation and for the separation of enantiomers, we tried to synthesis the cyclodextrin bonded phase and to measure its performance.

III. Contents of the Research

After synthesis of the cyclodextrin bonded phase, the separation of dansyl amino acid was performed by HPLC and the mechanism on the separation due to d,l-form amino acids and cyclodextrin inclusion complex was investigated.

IV. Results and Suggestions

1. On the separation of enantiomeric compound, β -cyclodextrin bonded phase has shown superiority over C18 column for d,l-phenyl alanine and o,m,p-nitroaniline.

2. Though it was not satisfactory even on cyclodextrin column for several bulky enantiomers of synthetic drug, profound potential could be found on application within near future.

3. For the separation of dansyl amino acid with β -cyclodextrin column, following enantiomers were separated; leucine, novaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid.

4. The strength of inclusion complex between d-form dansyl amino acid and β -cyclodextrin was superior to l-form amino acid making elution order reversed with GLC, chirasil-val column.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. Materials and Experimental Procedure.....	18
1. Reagents and Materials.....	18
2. Experimental Procedure.....	19
(1) The experimental condition of LC.....	19
(2) Synthesis of β -cyclodextrin stationary phase.....	19
(3) The efficiency of β -cyclodextrin stationary phase column on the enantiomers.....	21
(4) The separation of enantiomeric drugs synthesized.....	21
(5) The separation of enantiomeric Amino Acids.....	22
Chapter 3. Results and Observation.....	24
(1) The superiority of β -cyclodextrin bonded phase.....	24
(2) The separation of enantiomeric drugs synthesized.....	26
(3) The separation of AA Enantiomers.....	27
(4) Interaction between β -cyclodextrin & d,l-AA.....	31
Chapter 4. Conclusion.....	42
References	43

여 백

목 차

제 1 장 서 론	13
제 2 장 실험재료 및 방법	18
제 1 절 표준물질 및 시약	18
제 2 절 실험 방법	19
1. LC에서의 분석 조건	19
2. 원상 β -덱스트린의 고정상의 조제	19
3. 원상 덱스트린 고정상 컬럼의 효과비교	21
4. 유기합성 의약품 이성질체의 분리	21
5. 아미노산 이성질체 유도체의 분리	22
제 3 장 결과 및 고찰	24
1. β -Cyclodextrin bonded phase인 column의 효능	24
2. 의약품 이성질체의 분리	26
3. 아미노산 유도체들의 분리	27
4. β -Cyclodextrin과 광학이성질체 AA의 선택성	31
제 4 장 결 론	42
참 고 문 헌	43

여 백

제 1 장 서 론

Enantiomer는 물리적, 화학적 성질이 동일하여 구별하기 어렵고 다만 다른 광학이성질체와의 구조적 상호작용과 편광의 회전각도가 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 합성의약품 중 약 85%가 racemate로 판매되고있으나 대부분 거울상 이성질 의약품 중 오직 한쪽만이 의약적 효능이 있다고 보고되었다. 즉, 대부분 의약의 효능은 거울상 이성질체의 혼합물의 특성(흡착, 분배, 생리현상, 배설작용)으로서 평가 하지만, 많은 경우에 거울상 이성질체가 서로 다른 의약적 활성을 지니고 있음이 판명되었다. 따라서 신의약을 합성하여 정확한 약리효과 및 생리효과를 연구하는데 본 연구의 중요성이 있으며, 작용을 유발하는 한쪽 광학이성질체를 분리 후 제거할 수 있는 기술을 축적함으로써 제약산업에도 보탬이 되도록 하는 것이 본 연구의 목표이다.

생리적인 면에서 보면 광학이성질체의 선택성이 더욱 뚜렷해진다. catecholamine은 신체내 생성된 물질로서 tyrosine의 생합성에 의해서 생성되며 혈압조절과 기타 몸의 조절작용에 영향을 주고 있는 중요한 조절성 호르몬이다. catecholamine의 생합성 바로 직전의 물질은 L-dopa(3-hydroxy-L-tyrosine)으로서 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 좋다

는데 찾아볼 수 있다.

광학이성질체를 분리하는데 있어서 최초로 공헌한 사람은 1948년 파 스티르로서 (+), (--) -tartaric acid의 결정을 현미경과 핀셋을 이용하여 분리하였다. 이것은 역사적인 입장에서 중요한 mechanical separation이지만 응용면에서는 대단히 한정되어 있다. sodium ammonium tartrate의 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 반응할 때 덜 반응성이 있는 allene이 농축되어 분리되었다^{2,3)}. 효소도 여러종류의 생리적 천이에 촉매작용을 하며 한쪽 광학 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 장점으로 resolving agent나 이성질체의 순도등 조건이 까다롭지 않고 시료의 손실이 적으며 일반 시료에 적용할 때처럼 열역학적이거나 이론적인 지표들을 얻어낼 수 있다는 점이다⁶⁾. 고전적 거울상 이성질체 분리법과 다른 방법의 하나로써 진보된 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 되어지고있다.

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 interaction 과 hydrogen bonding등 molecular interaction에 의한 분리방법으로 나뉘어질 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 부분입체 이성질체 흡착물질의 무질서도(entropy)가 어느정도 차이가 있어야 한다. 또 컬럼자체의 높은 온도로 chiral정지상이 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 type 정지상은 reverse phase에 불안정한 단점을 지닌다. 이것보다는 현재 덜 사용하고 있는 cyclodextrin을 기초로한 column이 주요 생리 활성물질에 대해서 좋은 결과를 보여주고 있고 앞으로의 연구에 많은 기대가 모아지고 있다. Ligand exchange 방법을 사용한 것으로 주로 reverse phase column을 사용하였고 금속으로는 Cu^{2+} , Ni^{2+} 등을 사용하였다. Nimura⁷⁾등은 picomole의 AA를 N-(p-toluenesulfonyl)-L-phenylalanine을 넣어서 분리하였고 Lindner⁸⁾등은 (R,R)-tartaric acid mono-n-octylamide를 Kuniwa⁹⁾등은 N,N-dioctyl-L-alanine을 C_{18} 에 입혀서 hydrophobic한 AA를 분리하였고 Armani¹⁰⁾등은 L-aminoacylamide를 집어 넣어서 Dansyl AA를

Feibush¹¹⁾등은 N-w-(dimethylsiloxyl)-undecanoyl-L-valine을 Lepage¹²⁾등은 diethylene-triamine을 넣어서 Takeuchi¹³⁾등은 β -cyclodextrin을 집어 넣어서 Gilson¹⁴⁾등은 L-aspartylcyclohexylamide를 첨가해서 Lam¹⁵⁾은 L-proline과 구리를 첨가하여 광학이성질체 아미노산을 분리하였다. 이동상에 광학이성질 첨가물을 넣는 방법 이외에도 Pirkle 형태의 정지상을 이용할 수 있는데 Pirkle¹⁶⁾등이 합성한 정지상으로 광학이성질체의 다양한 분석방법을 시도하였고 Hyun¹⁷⁾은 Π -acidic과 Π -basic부분을 갖는 정지상을 개발하여 사용하였고 Hara¹⁸⁾등은 이성질체 아마이드를 immobilize한 정지상을 Bank¹⁹⁾등은 Pirkle의 전통적 정지상을 Pochapsky²⁰⁾등은 n-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino acid 유도체를 Yamashita²¹⁾등은 binaphalene 유도체를 정지상에 Salvadori²²⁾등은 L-lactic acid를 정지상으로 하여 유도체된 AA를 Finn²³⁾등은 Pirkle형 정지상에 고정시키는 법도 최근에 도입하였는데²⁴⁻³⁶⁾ 내포착물을 형성함으로써 Guest-Host분자의 상호작용으로 정지상이 안정하면서 분리능이 우수한 반면 적용범위가 Pirkle type보다 광범위하지 못한 단점이 있다. 다른 정지상으로 단백질³⁷⁾이라든지 triacetyl cellulose³⁸⁾, Riboflavin등도 사용하고 있다. SFC^{39,40)}도 이용되는 경우도 있고 Mass도 동원이 된경우도 있다^{41,42)}. GC는 오래전부터 광학이성질체를 분리하는데 이용되어 왔고⁴³⁻⁵⁴⁾ 주로 유도체를 만들어 시료의 휘발성을 높인 다음에 사용하였다. 주로 유도체화 반응에서는 아민기와 알콜, 초산기 등 작용기를 이용하여 polar group을 masking하게 되는데 주로 acylation과 esterification을 하게 된다. GC에서 acylation 반응을 이용하는 것은 2-chloroisovaleryl chloride⁵⁸⁻⁶¹⁾, (s)-2-methoxy-2-trifluoro methyl phenyl acetyl chloride^{62,63)}, (--)methyl chloroformate⁶⁴⁾등의 시약을 사용하였고 esterification의 반응을 이용한 것은 2-phenyl propionyl chloride⁶⁵⁾, 2-phenyl butyryl chloride⁶⁶⁾, O-acetyl lactic chloride^{67,68)}등이고 이때 acylation은 N-

carboxy-anhydride⁷¹⁻⁷³), N-TFA-propyl chloride⁷⁴), (–)-1-methoxy-1-methyl-1-(2-naphthyl)acetic acid⁷⁵)를 사용하였다. LC에서 esterification 반응은 MTPA-Cl^{76,77}), 1-(4-nitrophenyl)ethyl amine⁷⁸), methyl phenyl alaninate⁷⁹)등이 보고되었다. 본 실험에서는 광학이성질체분리의 제 3 차년도로서 bonded β -cyclodextrin을 합성하여 이의 효능을 살펴보았다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 시약 및 재료

정지상 합성에 기본적으로 필요한 물질로서는 실리카젤, 원상 덱스트린, 연결물질, 에폭사이드 셀룰로스등이 필요하다. 여러종류의 실리카젤중 spherisorb이라 불리는 영국제 Phase Sep이 좋은 결과를 나타내었다. 이곳의 구멍크기는 100 Å이고 표면적이 220 m²/g을 나타내고 5μm의 particle size를 유지하였다. 금속이온의 불순물들을 제거하기 위하여 0.1N HCl과 증류수, 메탄올로 세척하였고 silanization이 효율적으로 되도록 하였다. 순수한 원상 β-덱스트린은 ASTEC(Whippany, NJ, U.S.A.)에서 구입하였으며 100°C에서 P₂O₅ 존재하에 24시간 건조하였다. 원상 덱스트린과 실리카젤을 연결하기 위하여 여러가지 연결고리 화합물을 사용하였다. 그들은 7-octenyldimethylchlorosilane, (3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane, (3-glycidoxypropyl)triethoxysilane, 8-bromooctyltrichlorosilane(Sigma, U.S.A.)을 사용하여 더 정제하지 않고 사용하였다. 1g의 셀룰로스당 1밀리당량의 에폭시기를 갖는 에폭사이드 셀룰로스는 6개의 탄소연결고리를 갖는 공유결합으로 연결된다. 이 에폭시 셀룰로스는 -30°C에서 2일동안 냉동건조한후 사용하였다. 그밖의 물질로 silanol group을 차단하기 위한 Trimethyl chlorosilane, Hexamethyldisilane (Sigma, U.S.A.)을 사용하였다. 합성을 위한 용매로서 toluene과 acetone은 Sigma Chem. Co. (U.S.A.)에서 메탄올과 dimethyl-formamide는 J.T. Baker에서 구입하여 사용하였다. 원상 덱스트린을 활성화하는 sodium hydride는 Aldrich Chem. Co.에서 구입하였으며 질소로 충전하여 사용하였다. 표준아

미노산은 Sigma Chem. Co.(U.S.A.)제로 약 5.0--10.0mg을 취한다음 0.1N HCl에 녹여 volumetric flask에 옮겨 100mL 되게 채운다. 이 용액을 5.0mL 피펫하여 사용하였으며 Dansyl amino acid도 동일한 방법으로 묽혀 실험하였다. HPLC용 메탄올과 99.9% 초산은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, U.S.A.)제품을 aniline은 독일의 Merck사, benzaldehyde는 일본의 Kataya Chemical Co.의 1급 시약을 사용하였다.

제 2절 실험방법

1. LC에서의 분석조건

기기로서는 Varian vista 5500이나 Waters제품 HPLC를 사용하였으며 이동상으로 물, 메탄올, 초산을 이용하여 이성질체를 분리하려 시도하였다. 그러나 조성은 상태에 따라서 그 비율이 다소 변화하였다. 검출기로서 variable wavelength형의 UV-VIS을 사용하였고 229-280nm에서 시료를 측정하였다. 이동상은 isocratic mode로 0.5--1.0mL/min로 흘러 분석하였다.

2. 원상 β -덱스트린의 고정상의 조제

원상덱스트린의 정지상은 순도높은 실리카에 화학적으로 원상덱스트린을 고정화해서 합성된다. 원상덱스트린은 여러가지 다른 탄소수를 갖는 연결고리를 통하여 합성을 할 수있다. 상대적으로 짧은 3--4개의 탄소 연결고리를 갖는 화합물은 원상덱스트린 입체장에 때문에 만들기가 쉽지않은 반면, 연결고리의 수가 긴, 즉 탄소수가 18--20개 이상인 경우는 자유운동에 의해서 분해능이 떨어지는 단점을 지닌다. 이렇게 무수성 실리카젤과 반응기에 첨가를 하기위한 반응성이 높은 실란의 반응과정은 몇가지 시도해 보았다. 첫째 에폭사이드 실란을 반응에 이용할 수 있다. 그러나 커플링 반응도

중 에폭시 끝기가 반응성을 유지해야만 성공적으로 정지상을 합성할 수 있다. 둘째로 에폭시기 대신에 이중결합의 끝기를 가지는 ($R_1R_2R_3SiR_4CH=CH_2$, $R_1R_2R_3$:methoxy, ethoxy, alkyl 또는 할로젠화합물, R_4 :탄소수가 3--20개의 연결기)것으로 대체 할 수 있다. 다른 한 방법으로는 산화제와 7-octenyl dimethylchlorosilane을 사용해서 끝기를 에폭시기로 만드는 방법이다. 끝기의 에폭시는 원상덤프스트린이나 수산기를 갖는 다른 유기화합물과 반응하게 된다. 이 에폭시기는 sodium hydride와 반응한 원상덤프스트린과 결합하여 1차 알콜기에 연결된 고정상이 만들어진다. 이때 용매로서 toluene이나 피리딘을 사용하였다. 다른 방법의 하나로서 8-bromooctyltrichlorosilane과 같은 alkyl halide기를 갖는 실란을 이용하는 방법이다. 실란올에 한개의 연결고리 뿐만아니라 여러개가 실란올의 상태에 따라서 1개내지 3개의 실란올기가 형성될 수 있으나 입체장애로 인해 한개의 Si-O-Si결합이 주로 형성 되어지리라 여겨진다. 반응하지 않는 실란올은 trimethyl chlorosilane이나 hexamethyldisilanzane과 반응시켜 반응기를 없애 버린다.

실리카젤 20g 을 105°C에 맞추고 72시간 건조시킨다음 데시케이터에 넣어 상온으로 식힌다. 톨루엔 250mL 속에 실리카젤을 넣은후 1000mL의 flask에 넣어 모든 물이 빠질때까지 reflux시킨다음 90--95°C 정도로 식혀놓은 용액에 15mL의 건조(3-glycidoxypropyl)trimethoxysilane을 가하여 반응용액을 저어주면서 4--6시간 더 95°C에서 reflux를 계속한다. 반응혼합물을 상온까지 식힌다음 여과하고 toluene과 HPLC용 메탄올로 몇번 세척한 다음 50°C에서 원형 덤프스트린 10g을 100°C에서 24시간 건조시킨다음 건조한 상자속에 집어 넣는다. 10g의 반응성 실리카젤은 1000mL의 reflux flask속에 N,N'-dimethyl formamide 200mL와 넣고 원형 덤프스트린을 준비한다. 건조한 원형덤프스트린은 결정의 sodium hydride와 반응시 질소가 채워진 건조한 상태를 유

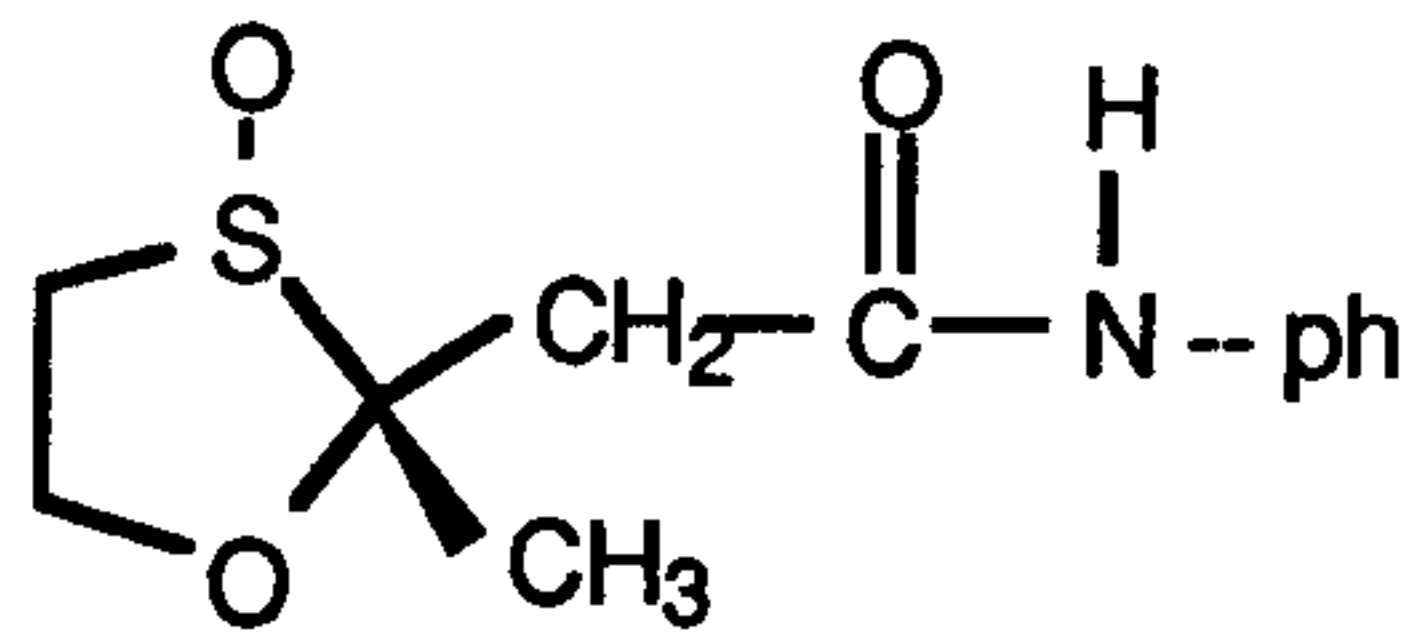
지하도록 한다. 10g의 원형덱스트린을 250mL의 삼각 flask속에 있는 125mL의 DMF속에 녹인 다음 당량보다 2배 많은 sodium hydride를 용액상에 넣는다. 반응을 원활히 하기 위하여 용액을 건조한 DMF속에 세게 10분간 저어준 다음 약 20분간 기다린 후 반응물을 여과하여 과량의 NaH를 없애도록 한다. 여과한 침전물이 화재가 나지 않도록 조심스레 건조되도록 한다. 약 120mL의 원형덱스트린의 나트륨염을 포함한 DMF용액을 건조상자에서 꺼내자마자 반응 용기에 같이 넣어 2-4시간 동안 reflux해서 완전히 고정상이 되도록 조절한 다음 상온에 까지 식도록 3시간 정도 놓아 두었다가 여과하고 DMF, 메탄올, 아세톤, toluene, 메탄올, 물 다시 메탄올 순서로 세척한 다음 건조시키면 원형덱스트린이 고정화된 고정상이 얻어진다. 고정화의 여부를 검사하기 위하여 α -naphthol검사를 수행한다. 적은 양의 고정상을 실리카젤 TLC에 입히고 α -naphthol용액(1.5 g의 α -naphthol과 7mL의 강황산을 넣어 에탄올 용액을 이용하여 총 50mL가 되게 한 것)을 살포한 다음 5분 동안 hot plate에 놓으면 짙은 보라색이 나오므로 해서 원형덱스트린의 고정화 정도를 측정하였다.

3. 원상 덱스트린 고정상 컬럼의 효과 비교

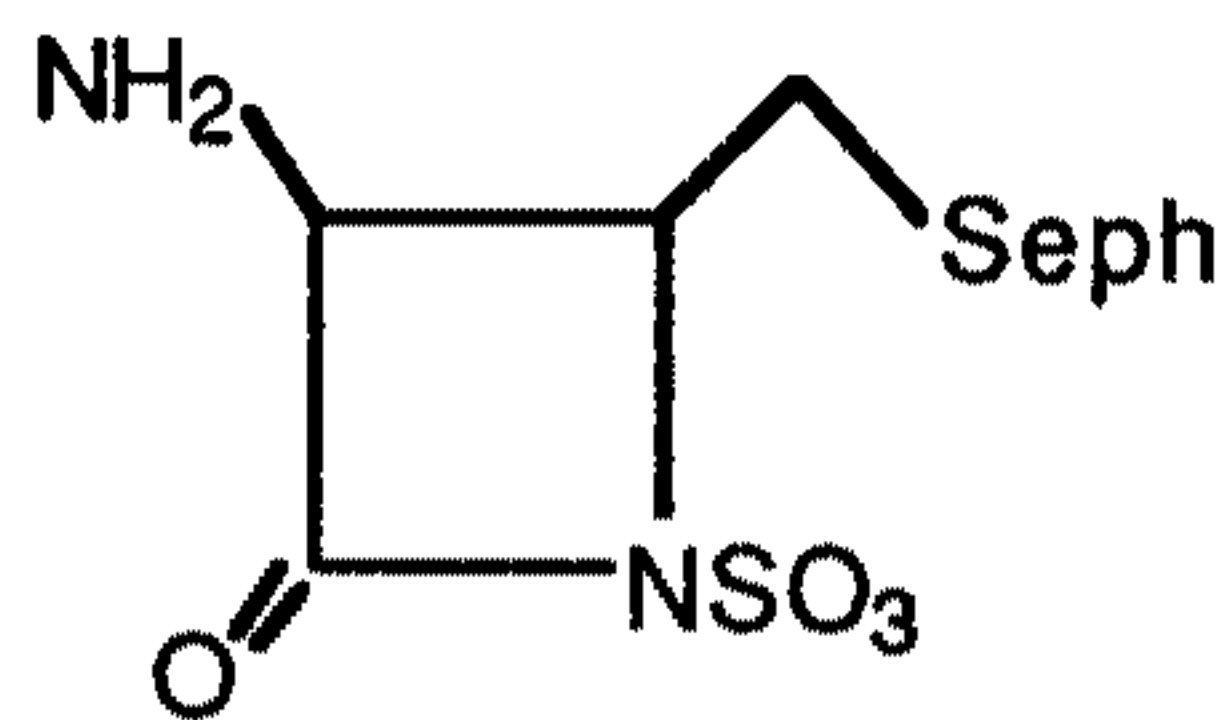
이성질체 분리능을 살펴보기 위해 ortho, meta, para의 nitroaniline을 혼합하여 HPLC분리를 시도하였다. 역상 크로마토그래피의 C18 column과 β -cyclodextrin고정상 컬럼을 사용하여 이성질체의 분리를 비교하였다. 또한 amino acid의 유도체인 Dansyl-d,l-phenyl alanine도 두 컬럼에서의 분리능을 비교하였는데 이동상으로 methanol, water, acetic acid를 사용하였다.

4. 유기 합성 의약품 이성질체의 분리

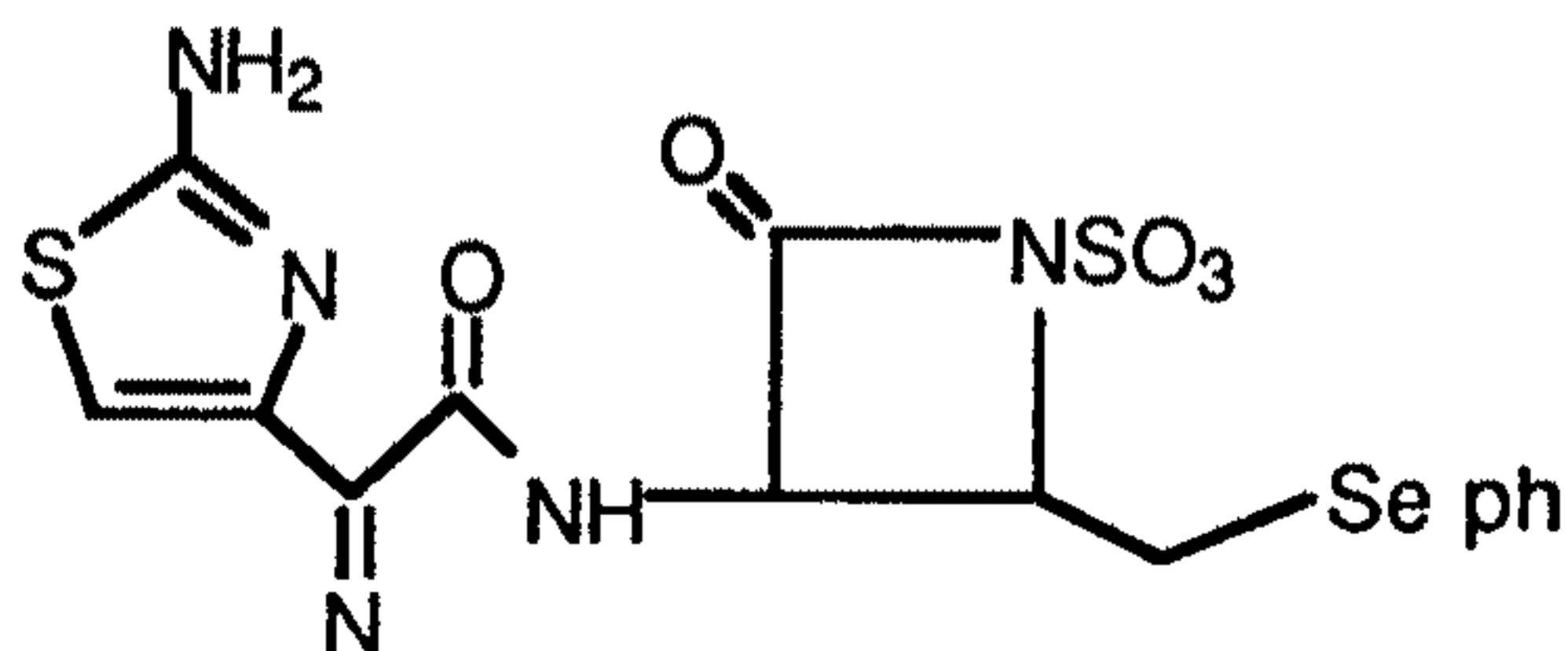
β -cyclodextrin을 사용한 유기 이성질체 분리의 가능성을 살펴보기 위해 의약합성시료인 아래의 A,B,C를 택하여 용해도문제를 감안하여 MeOH/Water/AcOH=78:20:2를 이동상으로 하고 229nm와 280nm에서 감지하였다.



(A) 1,3-oxathiolane-s-oxide



(B) (+) cis-3-amino-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid



(C) (+) cis-3-[(2-amino-diazole-4-yl)-2(methoxyimino) acetoamido]-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid triethylamine salt

5. 아미노산 유도체들의 분리

β -cyclodextrin을 정지상으로 하여 Dansyl amino acid 유도체들의 표준물을 대상으로 그 분리능을 실험하였다. 대상으로 Dansyl- α -amino-N-butyric acid, Dansyl-d,l-glutamic acid, Dansyl-glycine, Dansyl-d,l-leucine, Dansyl-d,l-norleucine, Dansyl-d,l-valine, Dansyl-d,l-norvaline, Dansyl-d,l-methionine, N-Dansyl-d,l-serine, N-Dansyl-d,l-threonine, Dansyl-d,l-phenyl alanine, Dansyl-d,l-

tryptophan, Dansyl-sarcosine으로 15종이다. 이 15종을 각각 MeOH/H₂O/
CH₃COOH를 78:20:2로 만든 이동상과 같은 용액에 0.1--0.3%로 만들어 10μl
씩 주입하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

1. β -cyclodextrin bonded phase인 column의 효능

C18 column과 β -cyclodextrin bonded column의 효능을 비교해 보기 위해 ortho, meta, para-nitroaniline과 Dansyl-d,l-phenyl alanine을 사용하였다. Nitroaniline은 0.005M의 농도를 갖게 섞은 다음 10 μ l씩 HPLC에 주입하였다. 이동상은 MeOH/Water 50:50을 사용하였고 용리되는 순서로서는 C18에서 para, meta, ortho순으로 되었고 β -cyclodextrin에서는 meta, ortho, para순으로 분리가 되었다. β -cyclodextrin과 para form nitroaniline이 제일 센 inclusion complex가 형성되었고 meta form보다는 ortho complex가 steric effect에 의해서 더 잘 cyclodextrin과 결합하였다. 이들의 retention parameter가 Table 1에 요약되어 있다. Dansyl amino acid중 d,l-phenyl alanine을 선택하여 β -cyclodextrin column과 C18 column을 사용하여 그 효능을 비교하였다. 이동상으로 MeOH/Water/AcOH를 78:20:2로 만들어 사용하였도 시료는 0.1%되게 하여 10 μ l씩 HPLC에 주입하였다. Figure 1에서와 같이 d,l-form이 분리되는 것을 볼 수 있었으며 분리능은 0.67을 보였다. 역상크로마토그래피를 같은 조건에서 실험하여 본 결과 전혀 분리가 되지 않았고 peak가 한개로 밖에 나오지 않았다. β -cyclodextrin이 이동상에서의 영향을 살펴보기 위하여 이동상인 MeOH/Water/AcOH=100:100:1에 β -cyclodextrin을 포화시켜 β -cyclodextrin이 이동상에 없을 때와 비교하여 보았다. 이때의 대상으로는 o,m,p-nitroaniline을 사용하였다. Figure 2에서와 같이 이동상에 β -cyclodextrin을 포화시켰을 때는 para, meta, ortho의 retention time이 8.27, 8.96, 10.69이었고 β -cyclodextrin을 첨가하지 않은 이동상에 C18-column에 의해 분리된 p,m,o-nitroaniline의 retention time은

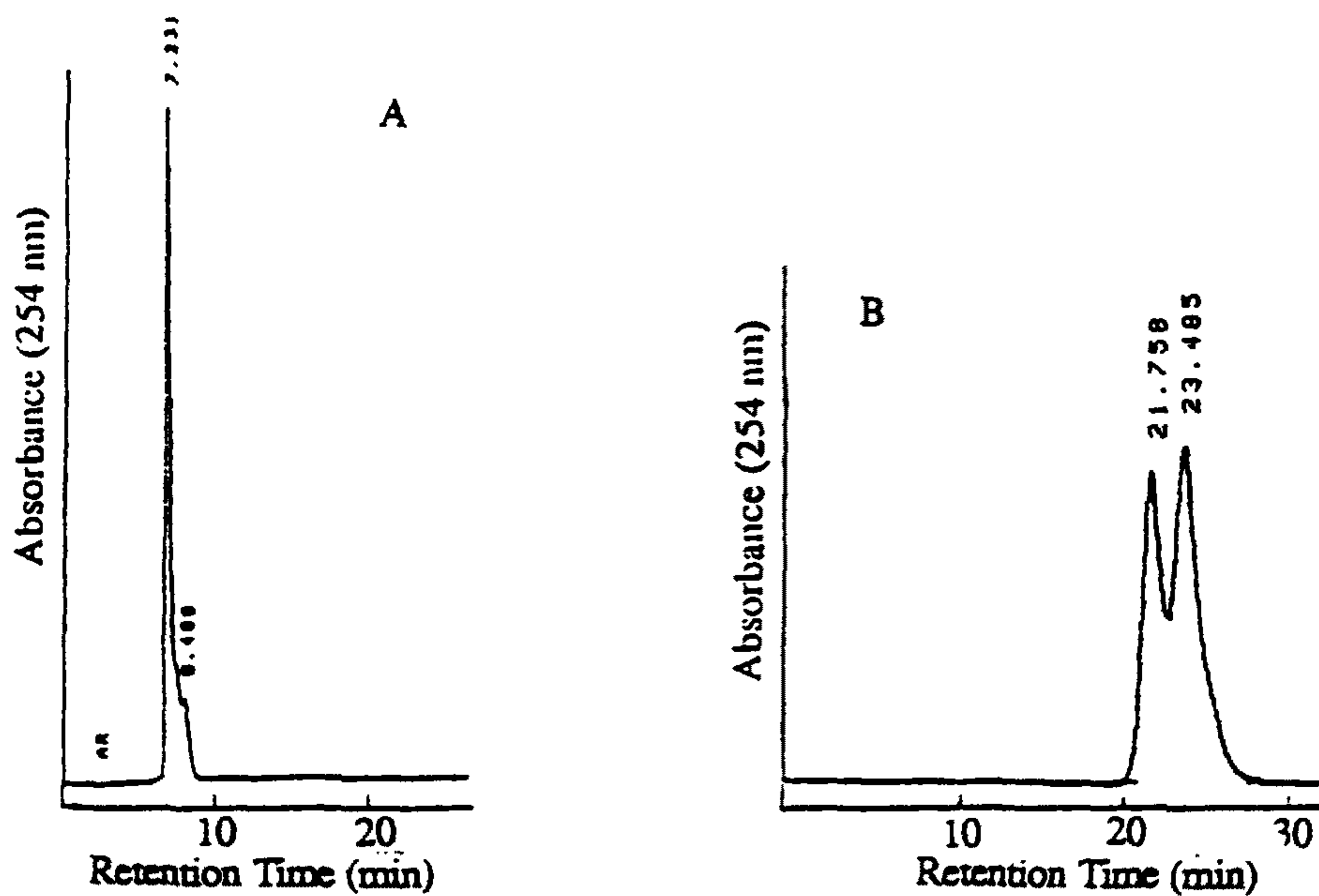


Figure 1. HPLC chromatogram of Dansyl-d,l-phenyl alanine with (A) C-18 column or (B) β -CD column using MeOH/Water/AcOH (78/20/2) mobile phase.

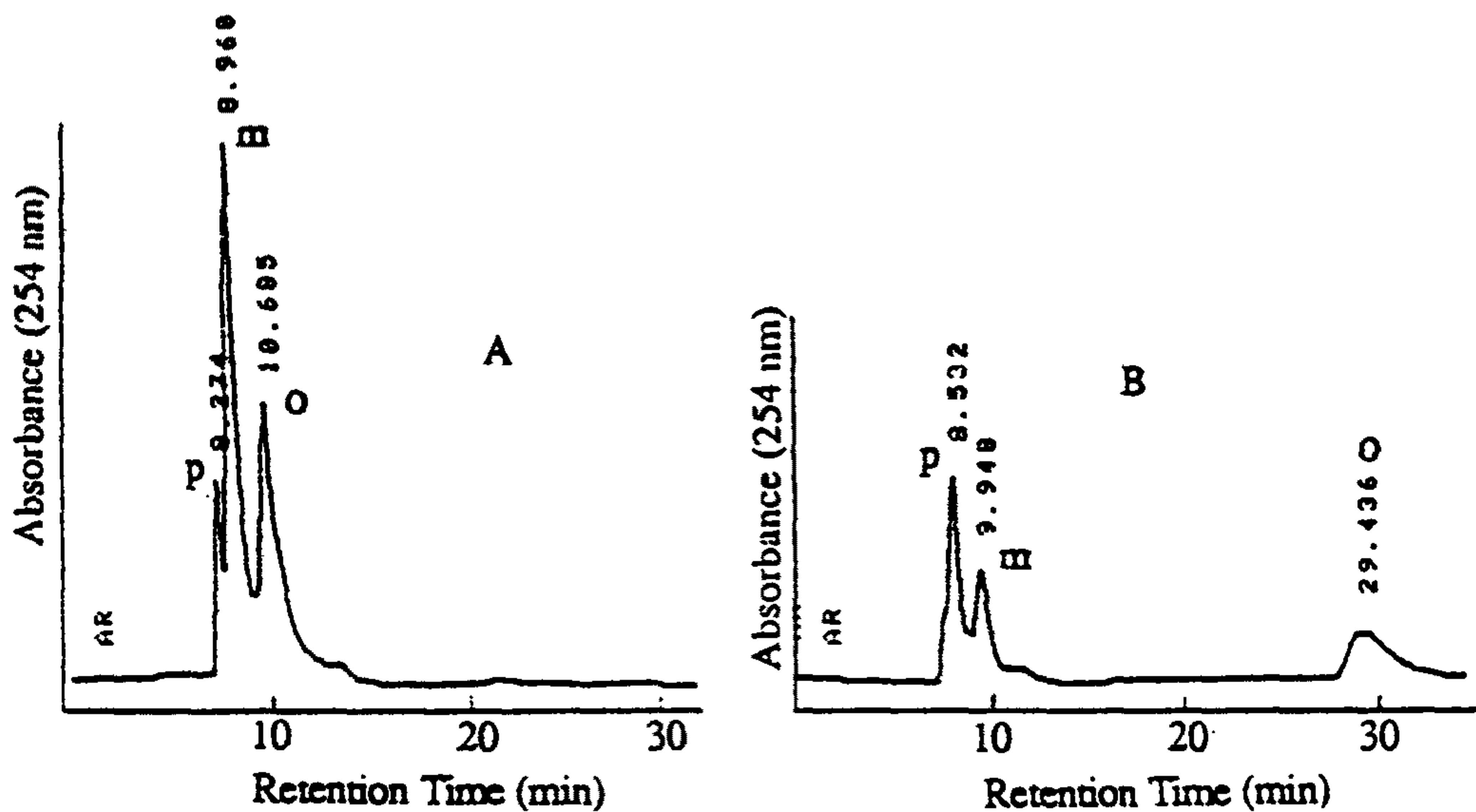


Figure 2. HPLC chromatogram of o,m,p-nitroaniline on (A) C-18 column composed of two mobile phase system (A) and (B): A; MeOH/Water/AcOH/ β -CD=100/100/1/1g, B; MeOH/ Water/AcOH= 100/100/1.

8.53, 9.95, 29.44로 증가하여 β -cyclodextrin이 nitroaniline과 inclusion complex를 형성함이 증명되었다. 특히 ortho 위치에서 제일 강하게 β -cyclodextrin과 inclusion complex를 형성하여 phenyl기가 interaction에 중요한 역할을 함을 표시해 주고 있다.

Table 1. Comparison of retention index on C-18 and β -CD column for the separation of o,m,p-nitroaniline with HPLC.

Column	Compound	(min) Retention time	Resolution	α	k'
C-18	p-nitroaniline	4.80	1.4	1.1724	1.45
	m-nitroaniline	5.22			1.70
	o-nitroaniline	6.40	2.2	1.3235	2.25
β -CD	m-nitroaniline	14.27	0.7	1.1045	3.35
	o-nitroaniline	15.25			3.70
	p-nitroaniline	48.60	11.2	3.5405	13.10

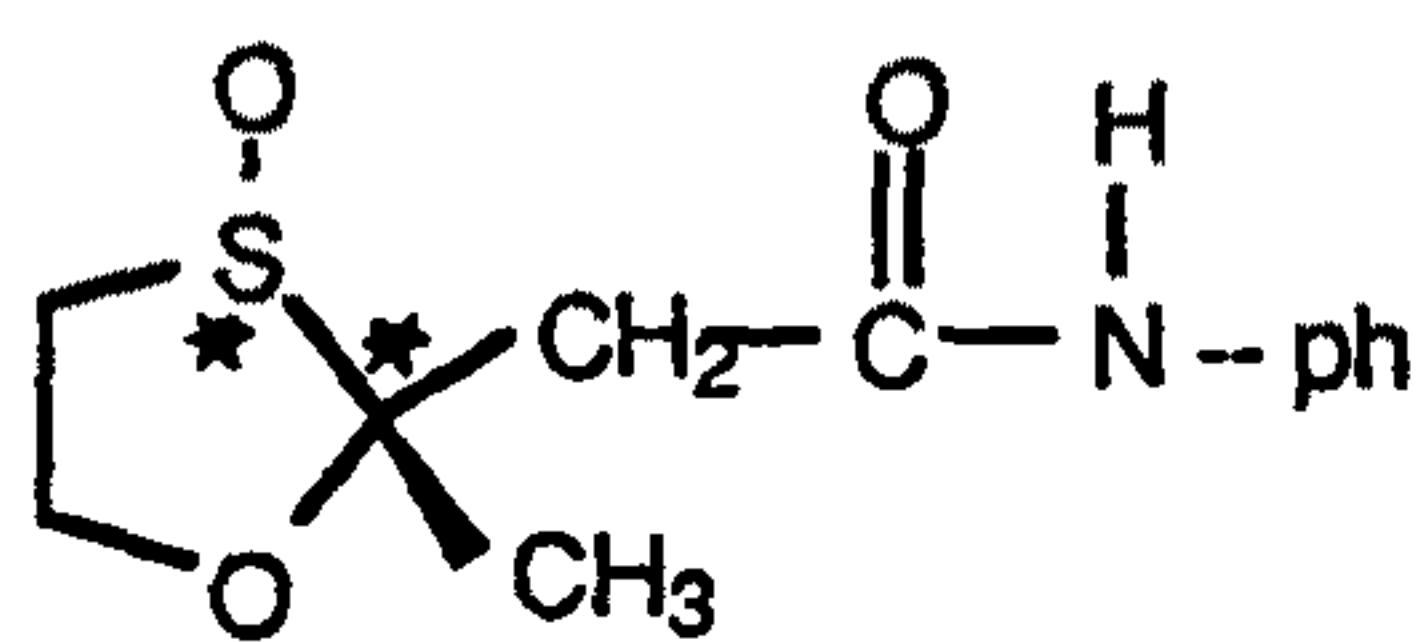
2. 의약품 이성질체의 분리

β -cyclodextrin column을 이용한 의약품 이성질체의 분리가능성을 살펴보기 위해 신의약합성팀에서 합성한 antibacterial drug의 일종인 1,3-oxathiolane s-oxide(A), (+)-cis-3-amino-4-(phenyl seleno-methyl)-2-azdtidinone-

1-sulfonic acid(B), (+)-cis-3-[(2-amino-diazole-4-yl)-2-(methoxyimino) acetoamido]-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid triethylamine salt(C)를 분리하여 보았다 (Figure 3,4,5). 각각의 compound가 2개의 Chiral center를 가지기 때문에 4종류의 이성질체를 가진다. 이동상으로 MeOH/Water/AcOH=78:20:2의 비율로 조성하여 0.1% 시료 10 μ l씩 주입하였다. Compound C를 분리능 0.7 이상으로 4개가 분리되었고 B는 3개의 peak로 분리되었으나 A는 다만 2종류로만 분리되어 결과는 만족스럽지 못하였다. 그러나 이동상의 조건을 바꿈으로 이성질체 각자의 분리능이 1.0이상이 되게 할 수 있는 가능성이 보여 실제 시료분석에도 β -cyclodextrin column이 효율적임이 밝혀졌다.

3. 아미노산 유도체들의 분리

아미노산 유도체들 중 Dansyl amino acid 표준물질 15종을 분리 대상으로 하였다. 이동상의 조성은 MeOH/Water/AcOH를 78:20:2로 하여 isocratic mode로 0.5mL/min로 조정하여 254nm에서 측정하였다. Leucine, norvaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid 등 11개의 Dansyl amino acid가 d,l-form이 분리되었다. 이들의 분리형태의 LC chromatogram이 Figure 6,7,8에 나타내었고 retention parameter가 Table 2에 정리되어 있다. 위에 기술한 amino acid는 분리능이 0.4--1.1정도 보여주어 실제 분리에 응용할 수 있었으나 γ -amino-n-butyric acid, tryptophan, sarcosine은 이성질체를 분리할 수 없었다. 동일한 조건하에서 C18 column으로 바꾸어 amino acid의 분리를 시도하여 보았으나 이 조건에서는 전혀 분리가 되지 못하였다. 표준물질의 분리시간에 따



(A) 1,3-oxathiolane-s-oxide

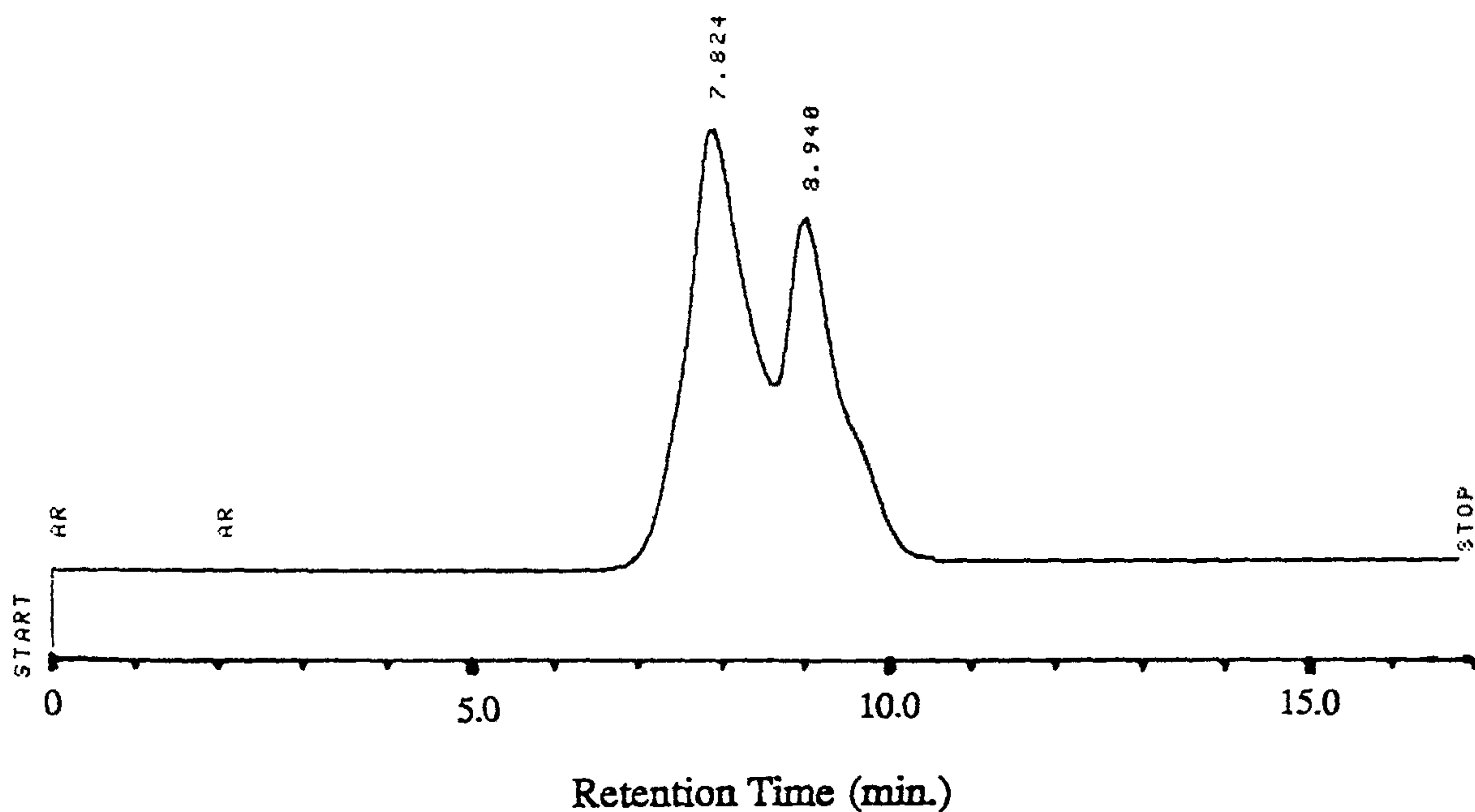
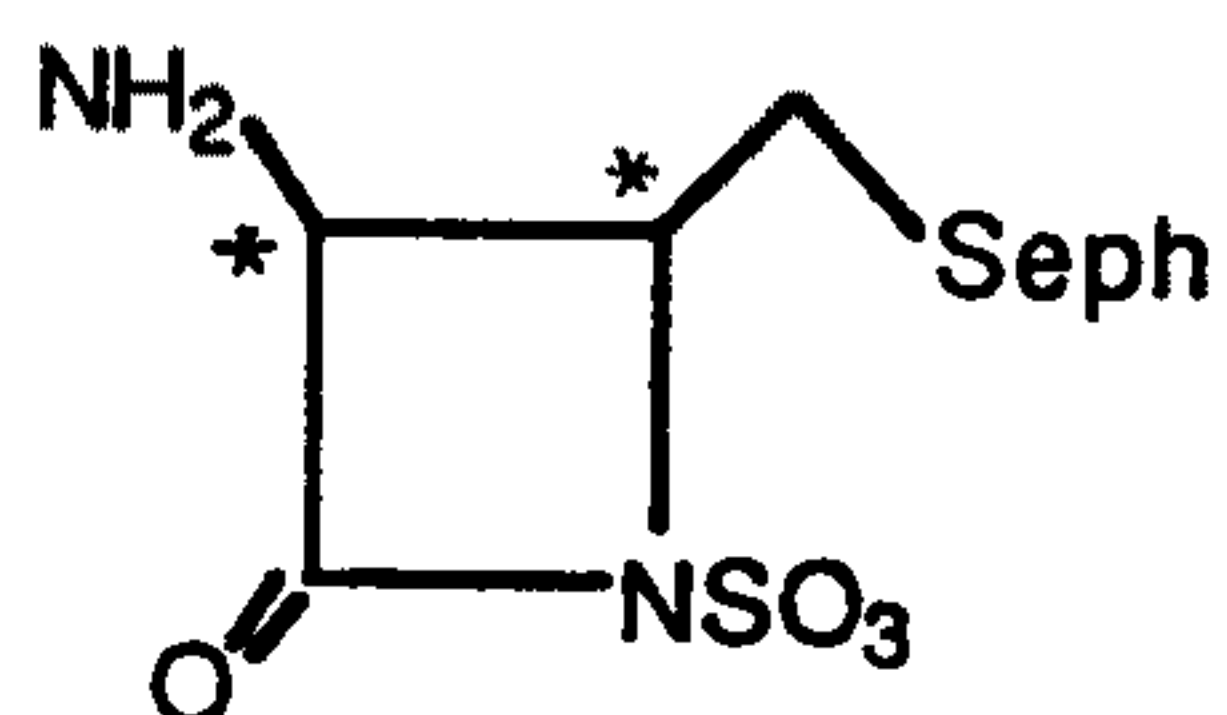


Figure 3. HPLC chromatogram of (A) 1,3-oxathiolane-s-oxide with β -Cyclodextrin column in methanol mobile phase, 0.9 mL/min flow rate. Monitored at 280 nm.



(B) (+) cis-3-amino-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid

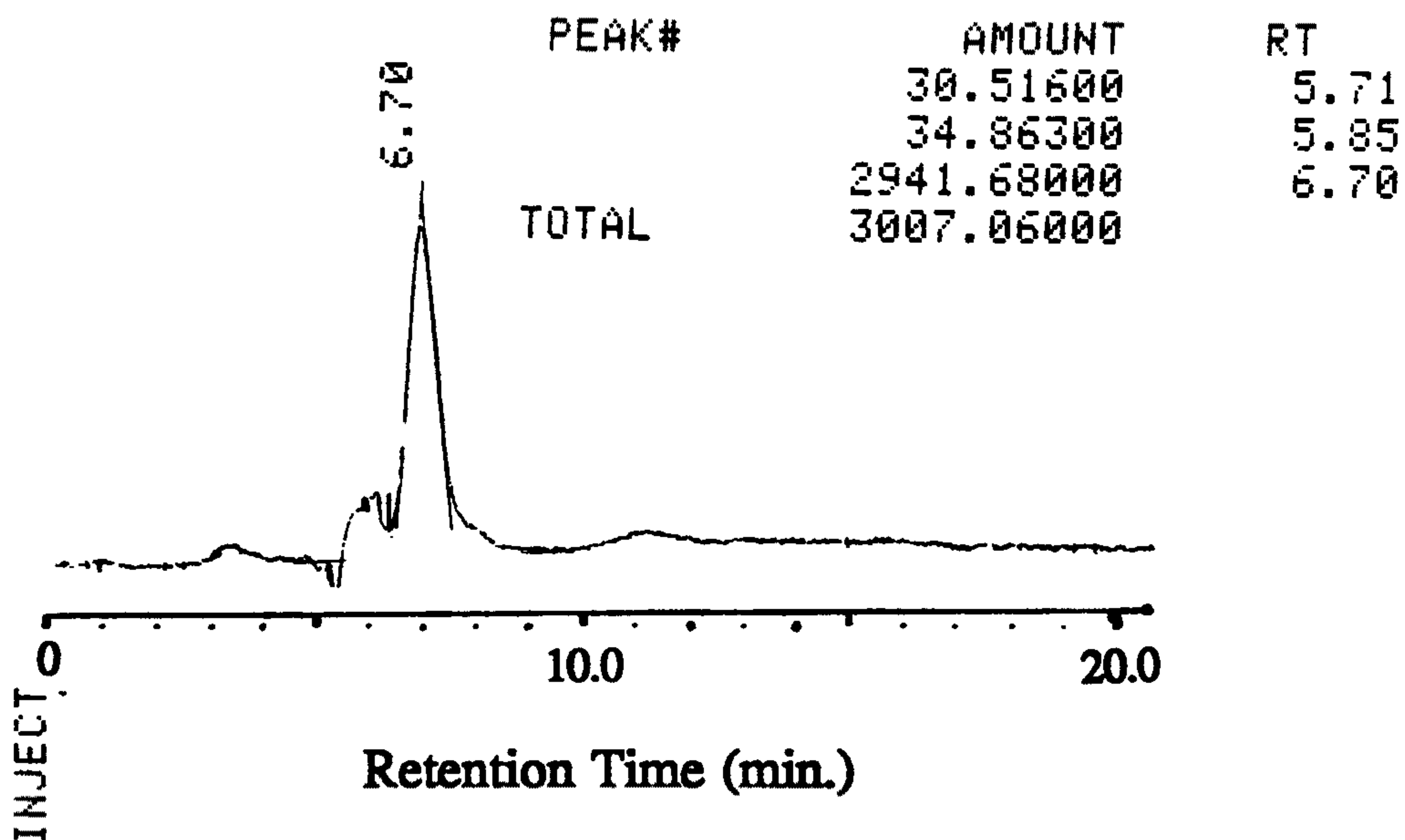
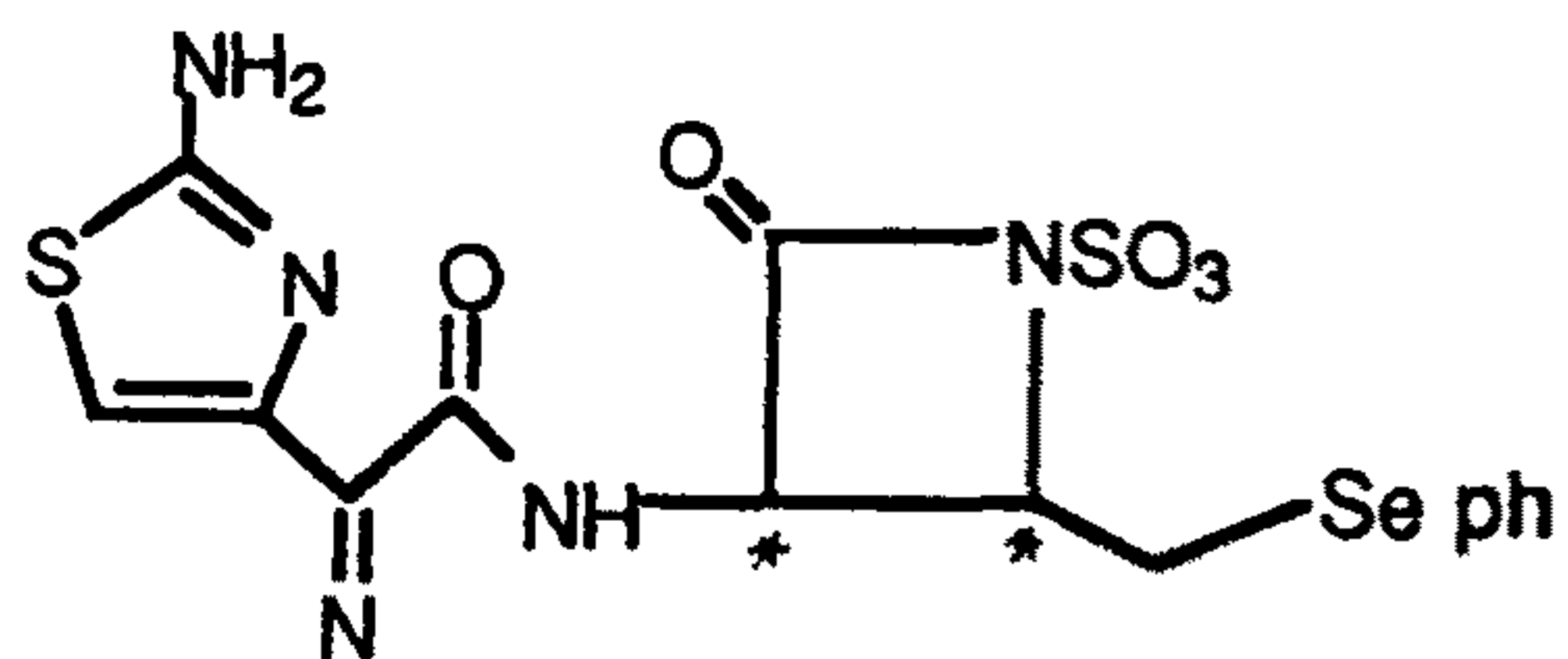


Figure 4. HPLC chromatogram of (B)APAS in 80% MeOH mobile phase and monitored at 229 nm.



(C) (+) cis-3-[(2-amino-diazole-4-yl)-2(methoxyimino) acetoamido]-4-(phenyl selenomethyl)-2-azetidinone-1-sulfonic acid triethylamine salt

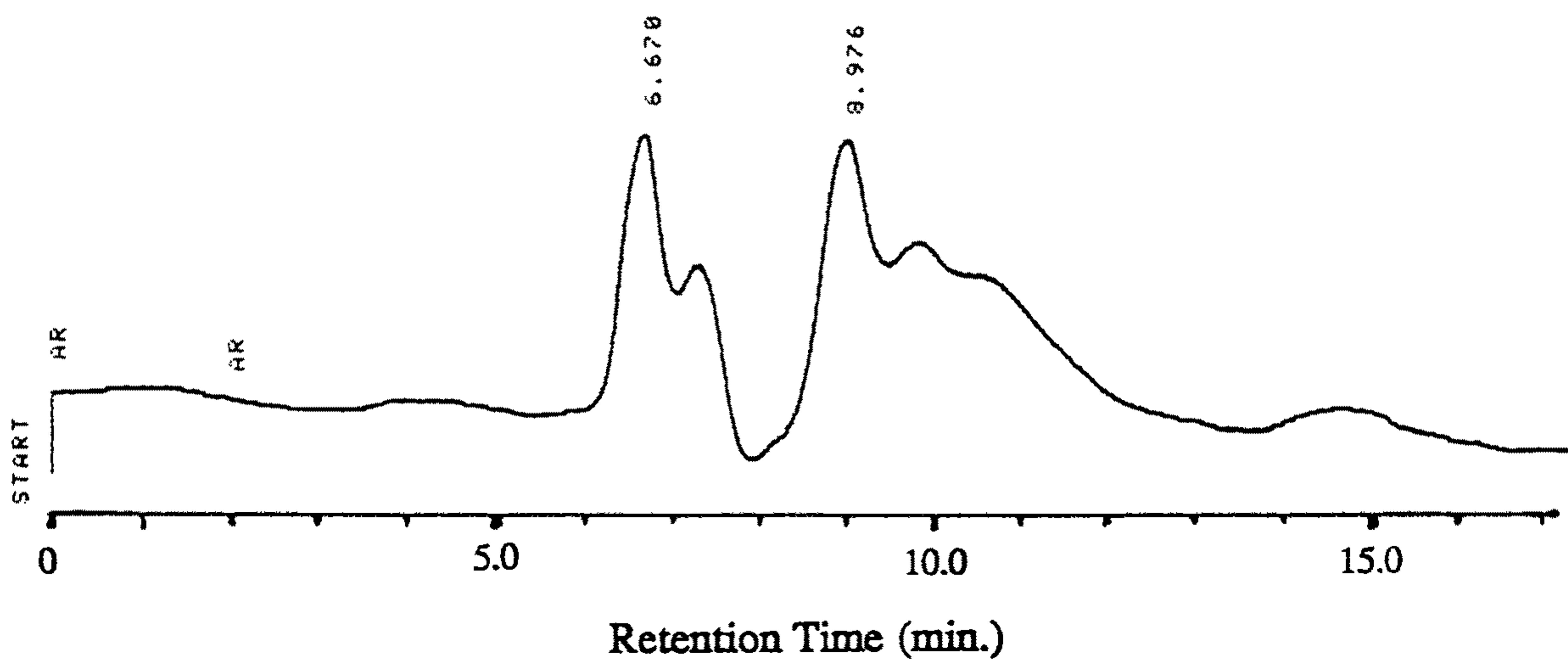


Figure 5. HPLC chromatogram of β -lactam derivative synthesized at KIST with the flow rate of 1.00 mL/min of MeOH and monitored at 210 nm.

라 leucine과 norvaline, methionine, glutamic acid 4종을 한 묶음으로 하여 group I 이라하고(Figure 9) valine, α -amino-n-butyric acid, phenyl alanine, threonine, serine, aspartic acid 6종을 group II라 하여 서로 분리하였다. 이때에 얻은 chromatogram이 Figure 10 에 도시하였다. 그러나 broad한 tailing으로 group I 에서 leucine과 norvaline의 d,l-form이 서로 겹치고 group II에서 phenyl alanine 과 threonine이 서로 겹쳐서 분리는 만족스럽지 못하였으나 그외 표준 아미노 산은 이성질체 분리가 되었다. Figure 11은 이중 α -amino-n-butyric acid, serine, aspartic acid를 분리한 chromatogram을 나타낸 것이다.

4. α , β -cyclodextrin과 광학이성질체 아미노산과의 선택성

α , β -cyclodextrin과 Dansyl amino acid 즉 α -amino-n-butyric acid, serine, aspartic acid의 inclusion complex의 정도를 비교하였다. 이들의 d,l-form 의 chromatogram이 Figure 11에 나타나있고 d,l-form complex의 정도를 측정하기 위하여 free amino acids의 정량에 이용하였다. 0.01% 표준물질 1 mL씩 α , β -cyclo-dextrin이 각각 1mg, 2mg, 5mg 들어있는 vial에 넣고 sonification한뒤 여과하여 10 μ L씩 β -cyclodextrin column에 주입하여 정량하였다. Table 3,4는 α , β -cyclo-dextrin을 1mg, 2mg, 5mg을 집어넣어 0.01% Dansyl amino acid와 inclusion complex를 되는 정도로 비교하여 본것이고 Table 5는 β -cyclodextrin 을 2mg으로 고정하고 analyte 농도를 0.005, 0.01, 0.02%로 변화하여 inclusion complex가 형성됨을 비교한것이다. 두 실험의 결과로 d-form이 cyclodextrin 과 착화합물을 더욱 잘 이룸을 알 수 있었다.

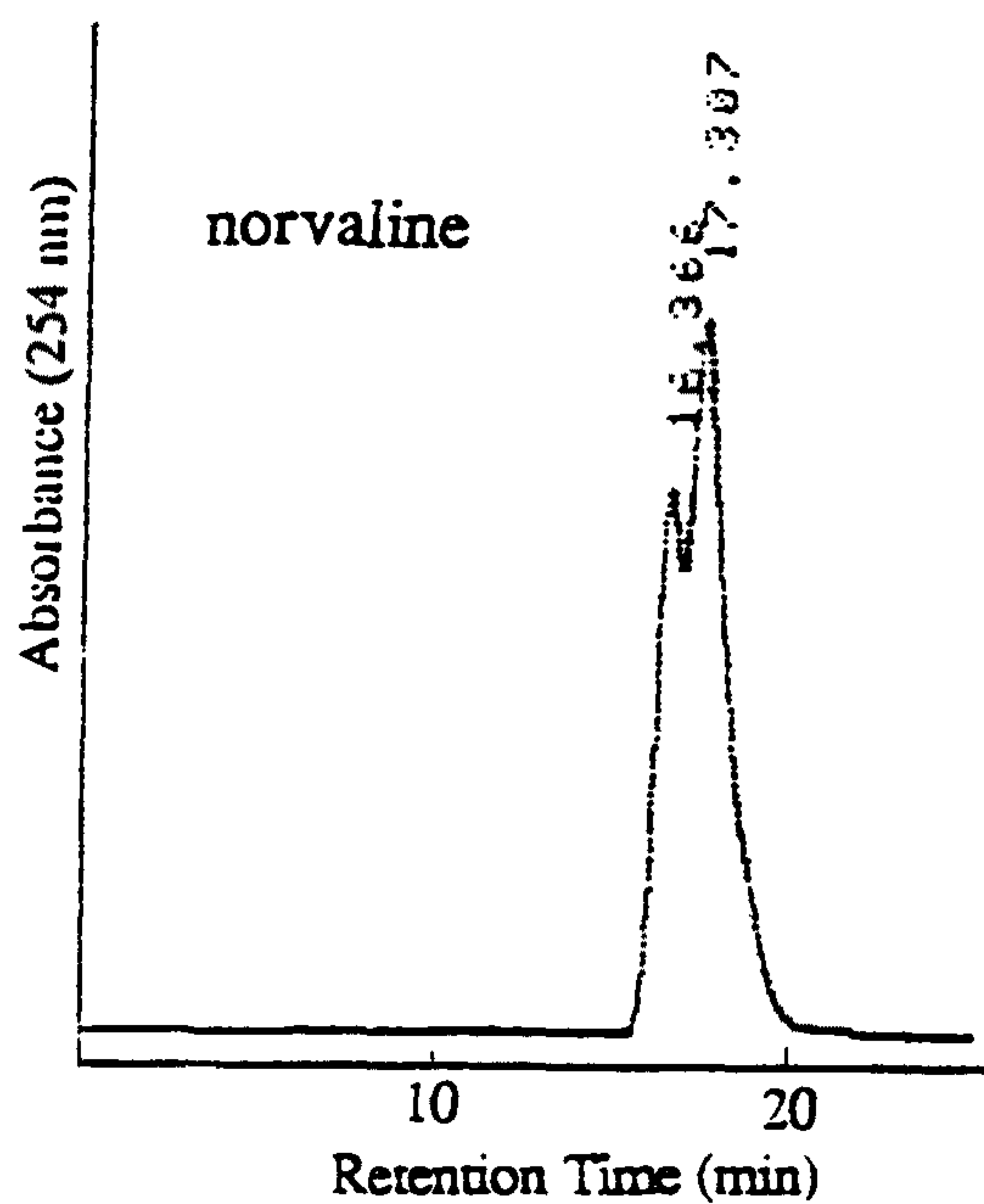
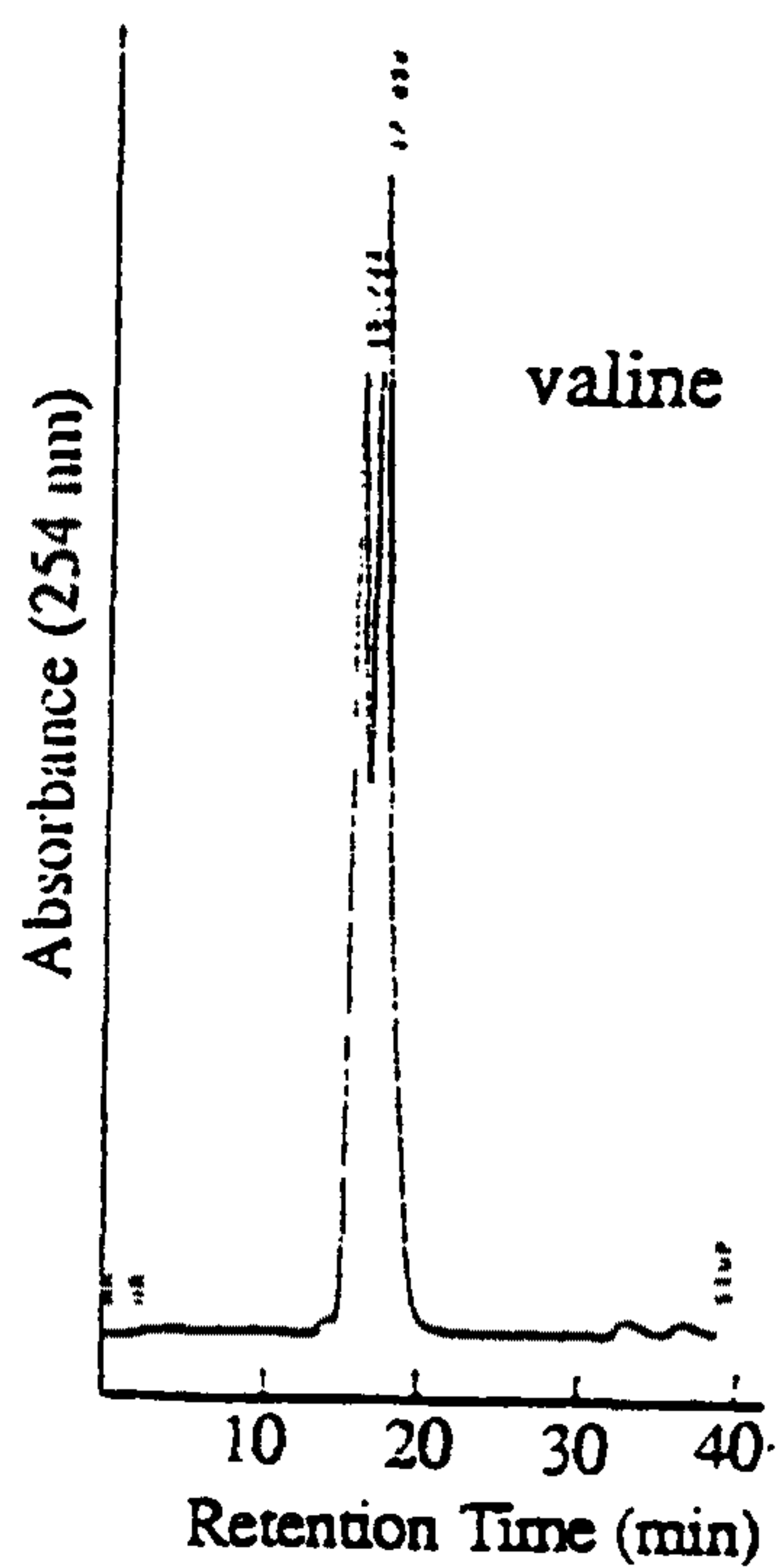
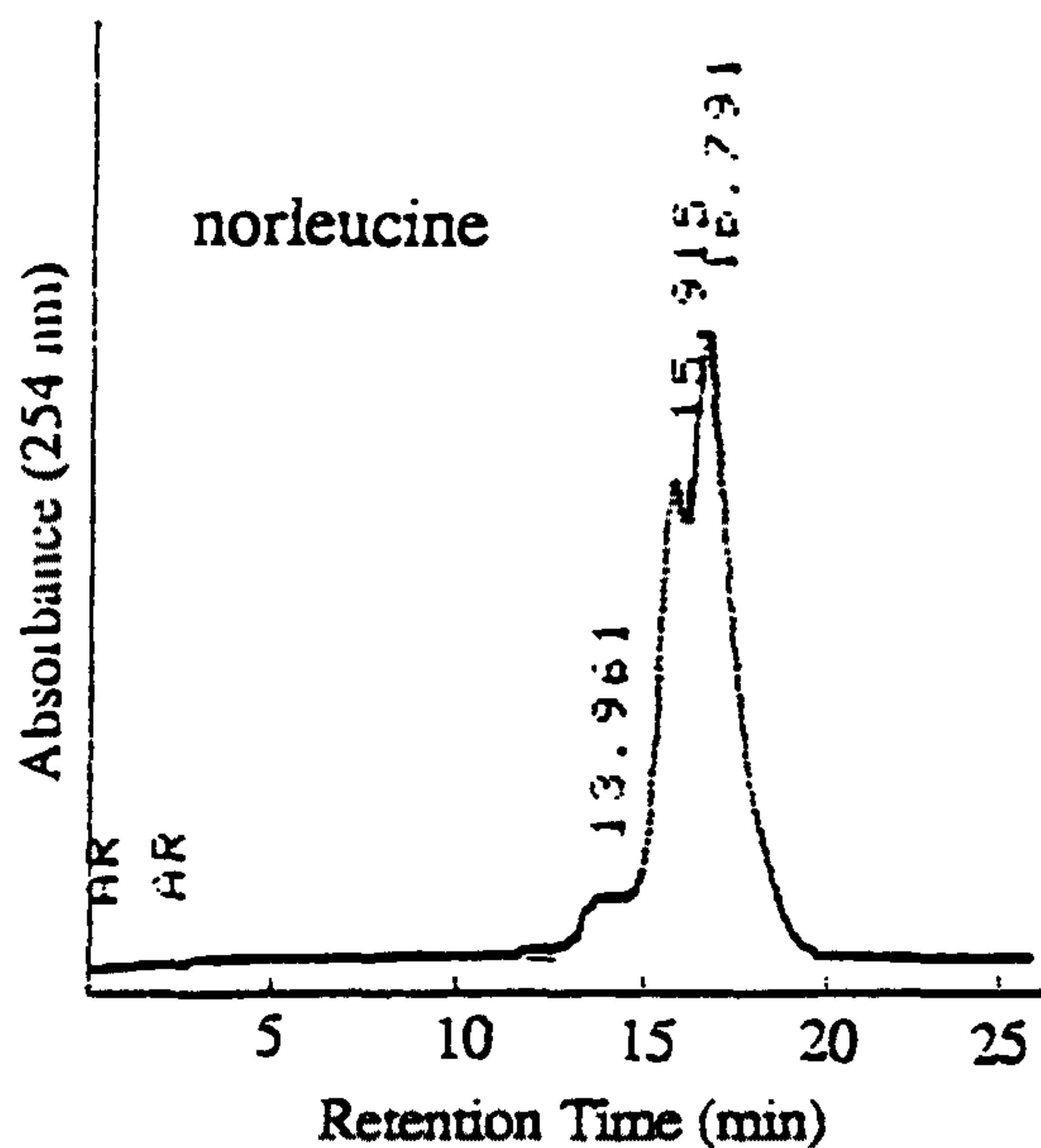
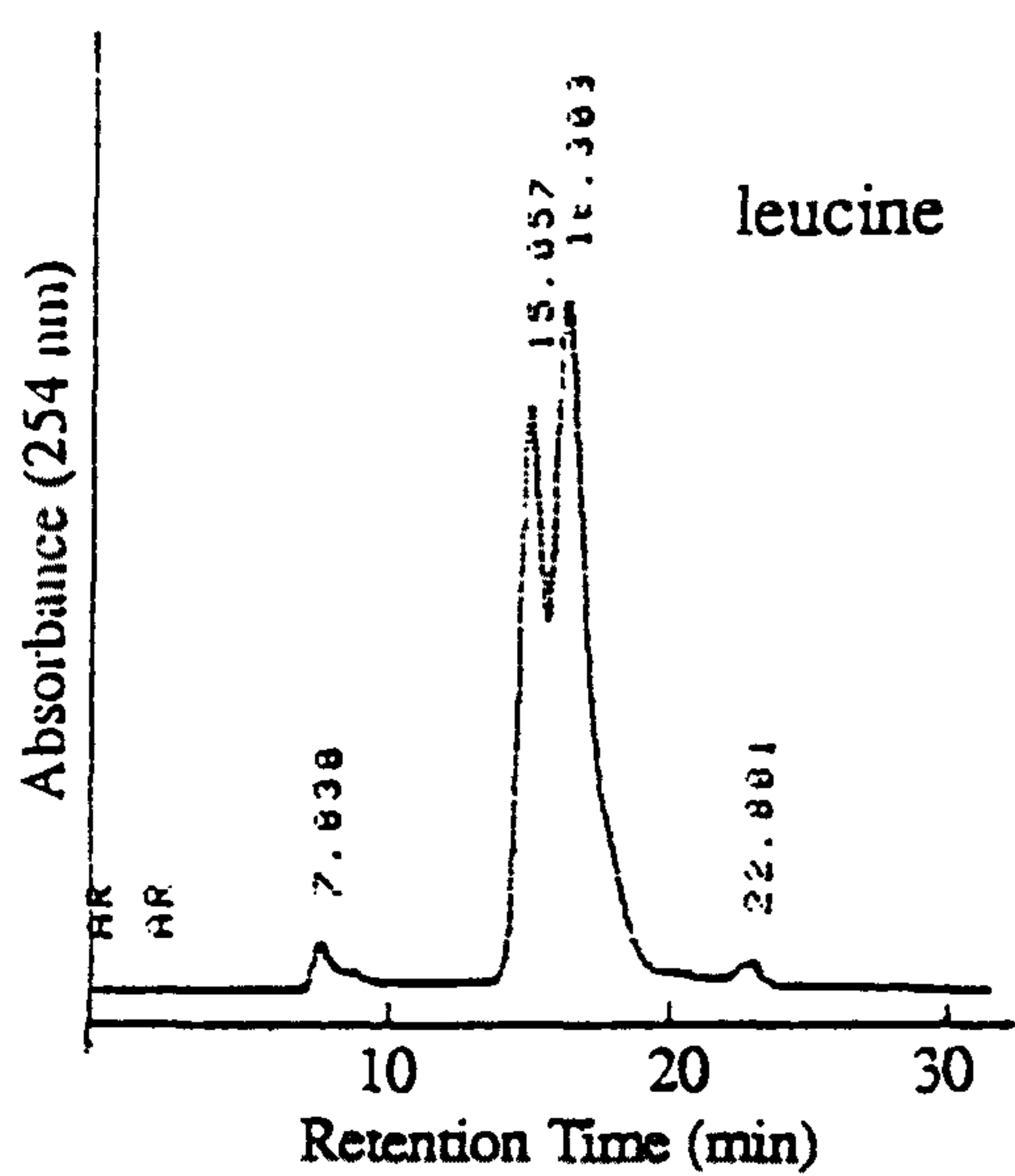


Figure 6. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

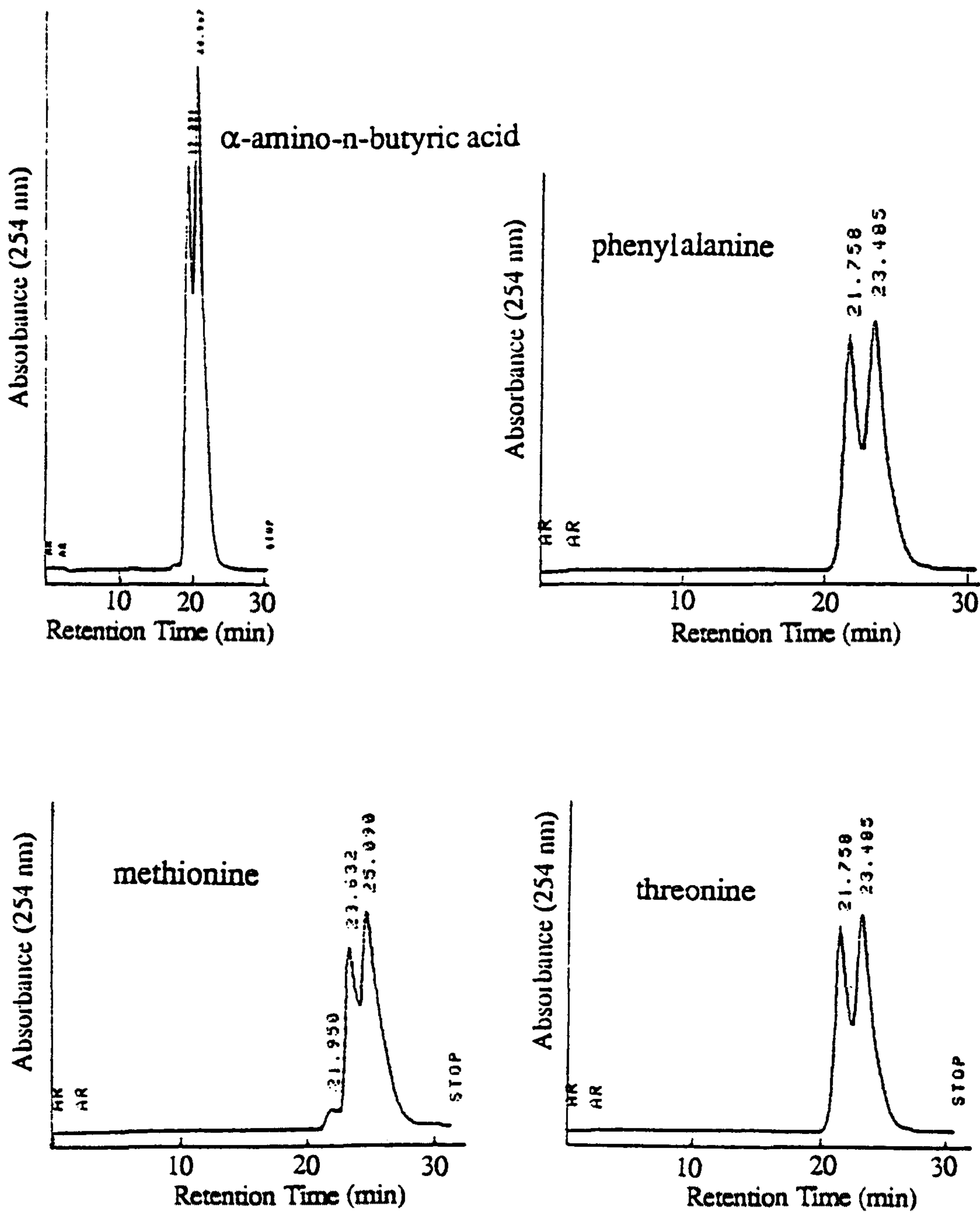


Figure 7. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

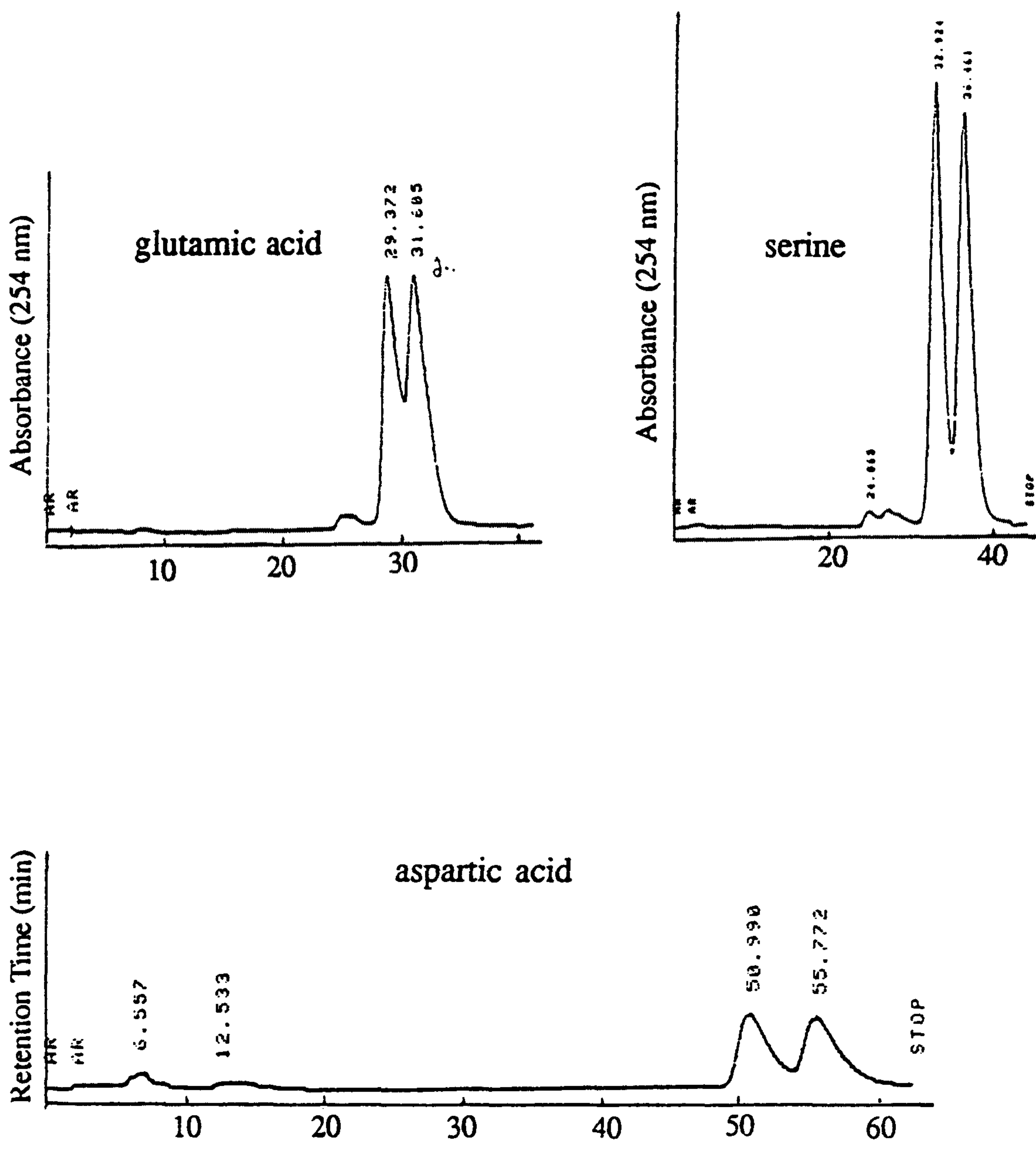


Figure 8. HPLC chromatogram of Dansyl-amino acids on β -CD column. For details, see text.

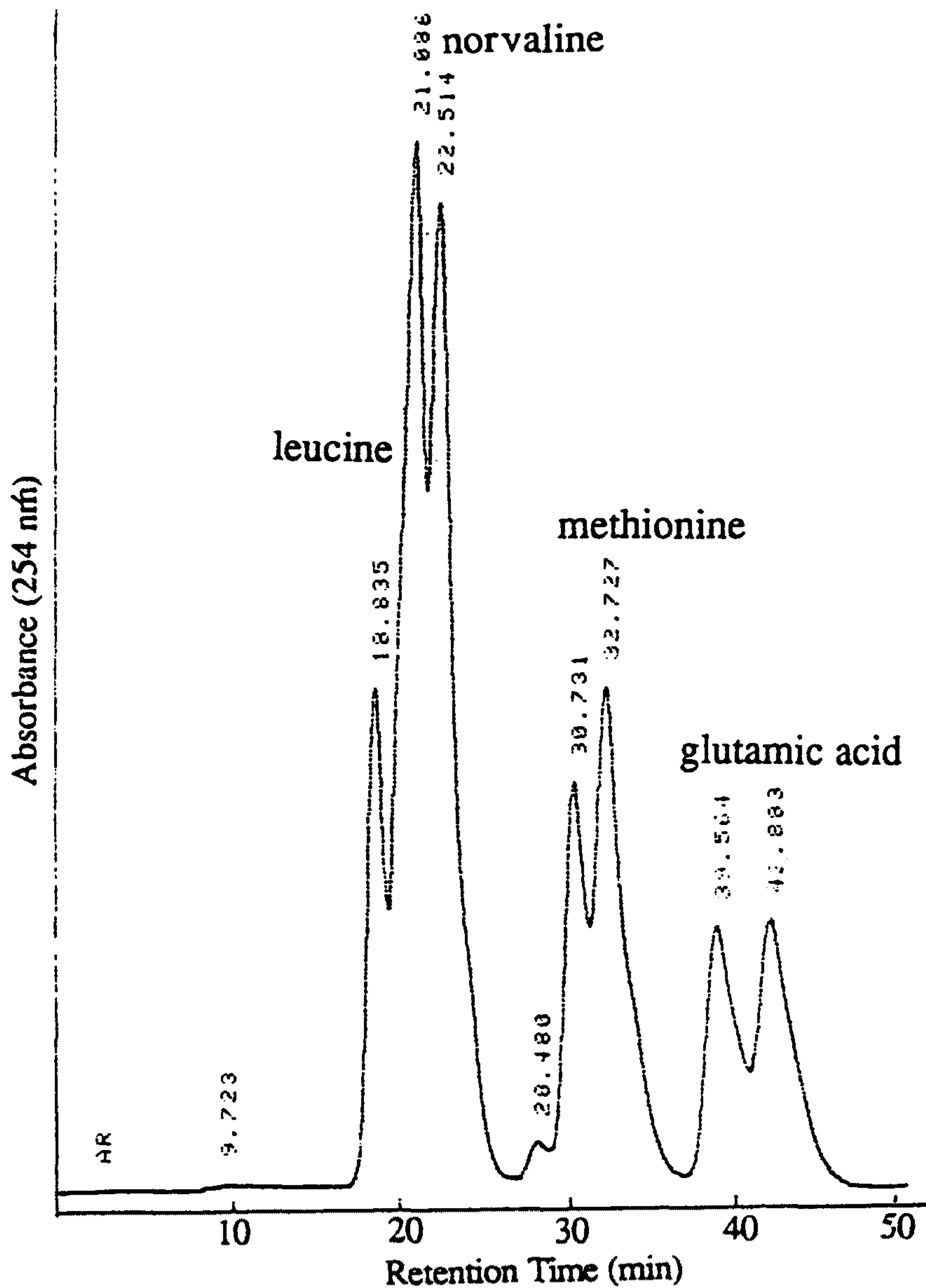


Figure 9. HPLC chromatogram of group I containing d,l-form of dansyl-leucine, novaline, methionine, glutamic acid. Mobile phase composed of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) as isocratic mode on β -CD column.

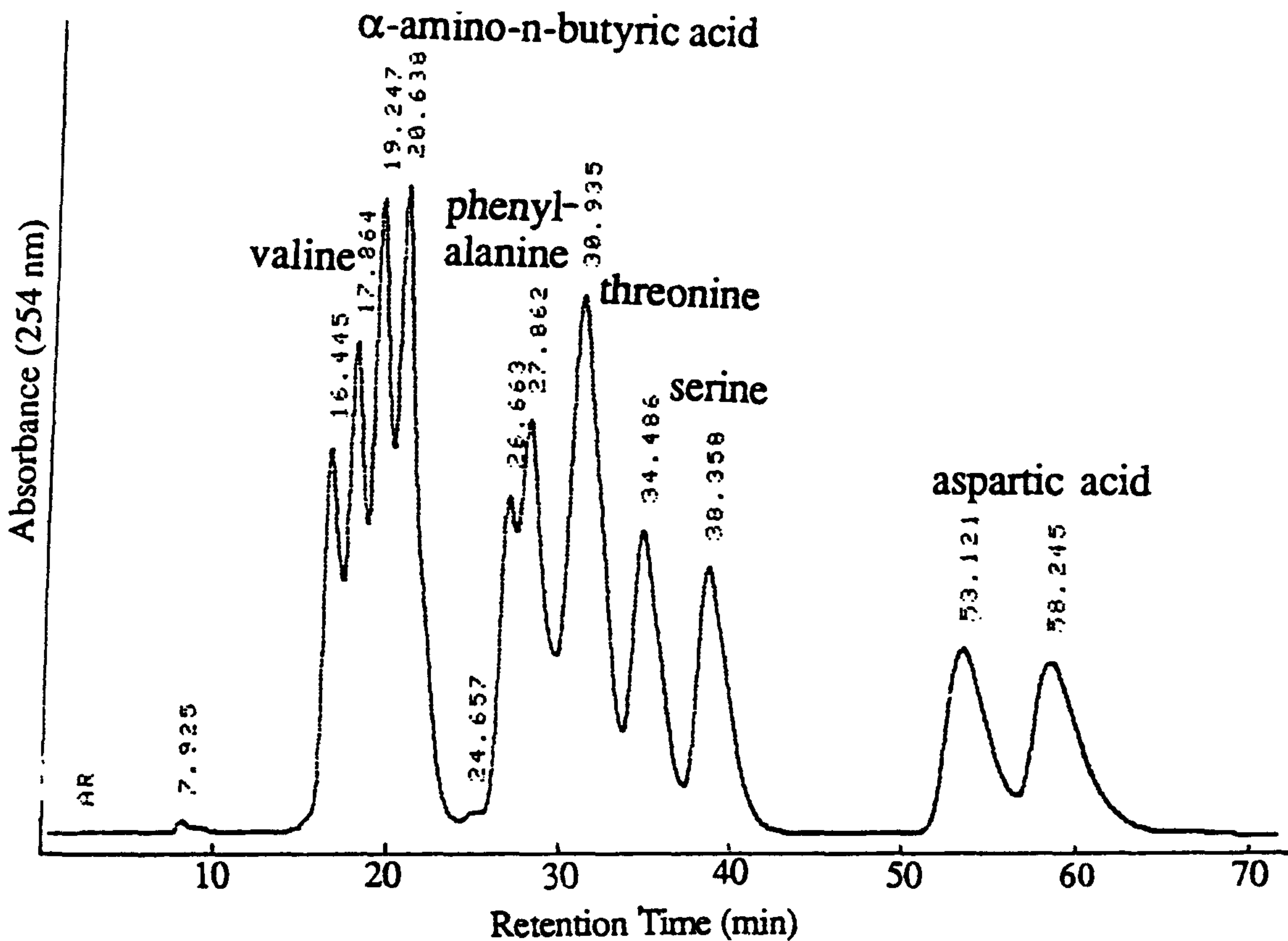


Figure 10. HPLC chromatogram of group II containing d,l-form of dansyl-valine, α -amino-n-butyric acid, phenyl alanine, threonine serine, aspartic acid. Mobile phase composed of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) as isocratic mode on β -CD column.

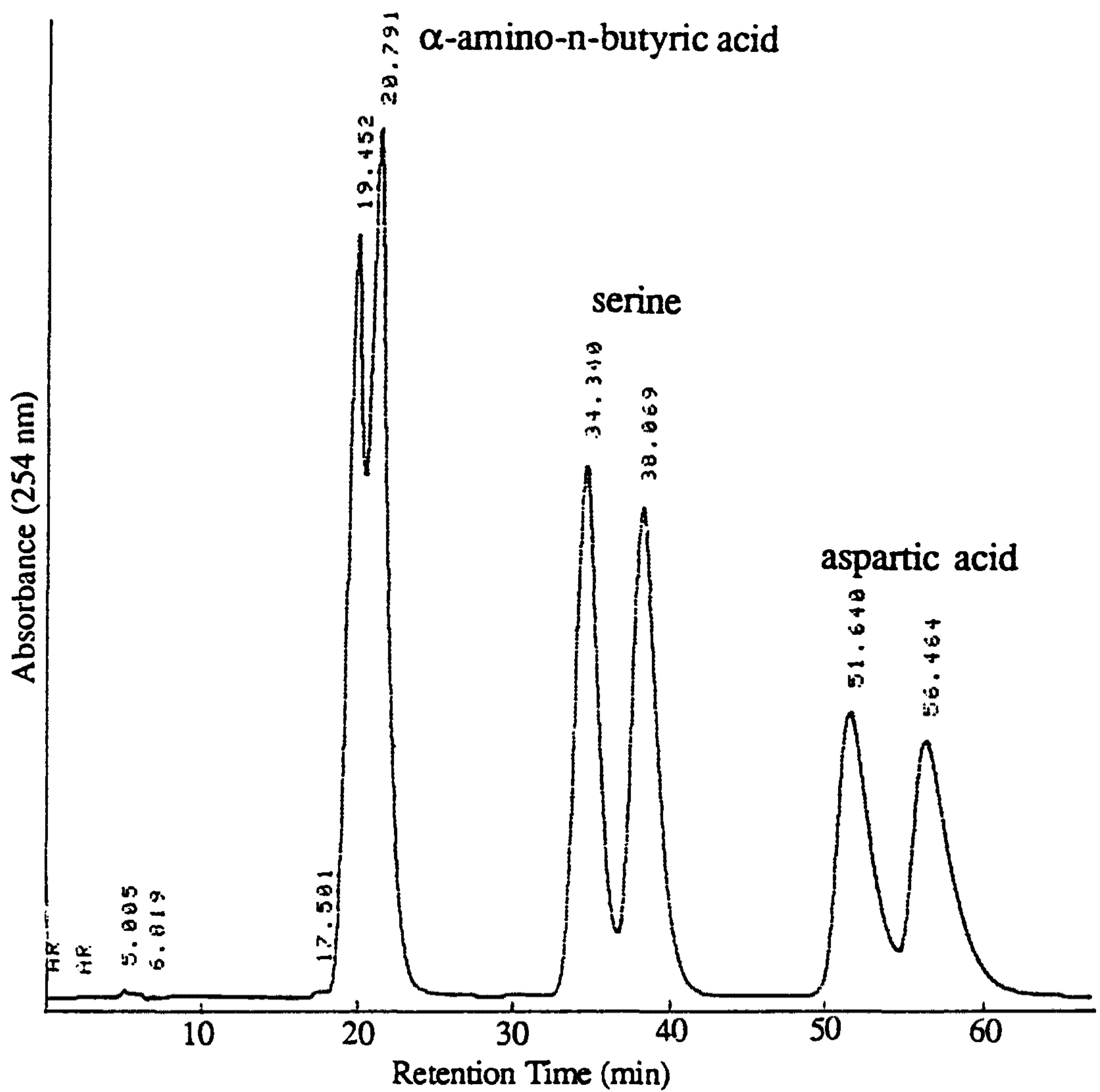


Figure 11. HPLC chromatogram of d,l-form of dansyl amino acid containing α -amino-n-butyric acid, serine, aspartic acid.

Table 2. Retention index of dansyl-d,l-amino acids on β -CD column, retention time, selectivity coefficient, capacity factor.

Dansyl-amino acid	Retention time	k'	Resolution	α
leucine	15.057	5.0	0.53	1.100
	16.304	5.5		
novaline	16.374	5.6	0.44	1.071
	17.316	6.0		
methionine	23.632	8.4	0.64	1.071
	25.090	9.0		
glutamic acid	29.372	10.7	1.06	1.084
	31.605	11.6		
valine	15.722	5.2	0.67	1.096
	17.058	5.7		
α -amino-n-butyrac acid	18.451	6.8	0.48	1.082
	19.719	7.4		
norleucine	15.915	5.3	0.36	1.076
	16.791	5.7		
phenyl alanine	21.758	8.4	0.67	1.036
	23.485	8.7		
threonine	25.180	9.1	0.92	1.176
	29.203	10.7		
serine	32.924	12.2	1.00	1.115
	36.461	13.6		
aspartic acid	50.990	19.4	1.03	1.098
	55.772	21.3		

Table 3. Test of selectivity between dansyl-d,l-amino acid and various amount of α -CD mixture. Concentration of analyte was set up at 0.01 % all through the experiment.

Dansyl AA	Amount of α -CD with 0.01 % AA in 1 mL				
		0 mg	1 mg	2 mg	5 mg
α -amino-n-butyrac acid	Retention Time	(min)			
	l-form	18.917	18.272	18.489	18.748
	d-form	20.155	19.799	19.657	19.760
	Peak Area				
	l-form(AI)	15.029	14.618	15.185	15.311
d-form(Ad)	23.637	25.471	25.761	27.689	
	Ratio(AI/Ad)	0.6358	0.5739	0.5895	0.5530
serine	Retention Time	(min)			
	l-form	33.428	33.250	32.719	33.315
	d-form	37.110	36.978	36.234	37.040
	Peak Area				
	l-form(AI)	18.282	16.894	17.930	19.934
d-form(Ad)	18.540	17.076	18.354	20.585	
	Ratio(AI/Ad)	0.9861	0.9895	0.9769	0.9684
aspartic acid	Retention Time	(min)			
	l-form	50.439	49.930	49.375	49.945
	d-form	55.355	55.067	53.970	55.079
	Peak Area				
	l-form(AI)	12.082	12.778	10.724	7.585
d-form(Ad)	12.429	13.164	11.149	8.122	
	Ratio(AI/Ad)	0.9721	0.9707	0.9619	0.9339

1. Separation was performed through β -CD column with mobile phase of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) isocratic system.

Table 4. Test of selectivity between dansyl-d,l-amino acid and various amount of β -CD mixture. Concentration of analyte was set up at 0.01 % all through the experiment.

Dansyl AA	Amount of β -CD with 0.01 % AA in 1 mL				
		0 mg	1 mg	2 mg	5 mg
α -amino-n-butyrac acid	Retention Time (min)				
	l-form	18.917	18.510	18.465	19.051
	d-form	20.155	19.592	19.597	20.224
	Peak Area				
	l-form(Al)	15.029	13.037	15.630	15.403
d-form(Ad)	23.637	23.721	28.288	28.811	
	Ratio(Al/Ad)	0.6358	0.5496	0.5525	0.5346
serine	Retention Time				
	l-form	33.428	32.923	32.988	34.036
	d-form	37.110	36.588	36.621	38.010
	Peak Area				
	l-form(Al)	18.282	17.819	20.286	18.339
d-form(Ad)	18.540	18.919	20.953	18.282	
	Ratio(Al/Ad)	0.9861	0.9419	0.9682	1.003
aspartic acid	Retention Time				
	l-form	50.439	49.800	49.520	51.588
	d-form	55.355	54.823	54.415	56.800
	Peak Area				
	l-form(Al)	12.082	11.053	5.251	9.071
d-form(Ad)	12.429	11.753	5.581	8.897	
	Ratio(Al/Ad)	0.9721	0.9401	0.9409	1.020

1. Separation was performed through β -CD column with mobile phase of MeOH/Water/AcOH(78/20/2) isocratic system.

Table 5. Equilibrium condition between dansyl-d,l-amino acid and various amount of analyte mixture. The concentration of cyclodextrin was fixed at 0.2% all through the experiment.

Dansyl AA	Concentration of Analyte (Wt %)		
	0.005	0.010	0.020
α -amino-n butyric acid	0.885	0.9398	1.1117
serine*	1.0282	1.0058	0.9953
aspartic acid	1.0552	1.0425	1.0148

* serine is mixed with 0.2% α -cyclodextrin, others with 0.2% β -cyclodextrin.
 1. Numbers represents for the ratio between two enantiomers.

제 4 장 결 론

1. β -cyclodextrin bonded phase를 합성하여 C18 column과 비교하여 본결과 d,l-phenyl alanine 및 o,m,p-nitroaniline 분리에 있어서 우수한 효능이 있음이 증명되었다.
2. Bulky한 신의약품중 광학이성질체의 분리는 β -cyclodextrin column도 별로 좋은 분리능을 보여주지 못하였다.
3. Dansyl amino acid의 이성질체 분리는 β -cyclodextrin column을 사용하였을 경우 leucine, norvaline, methionine, glutamic acid, valine, α -amino-n-butyric acid, norleucine, phenylalanine, threonine, serine, aspartic acid가 분리되었다.
4. Inclusion complex의 정도를 Dansyl-amino acid로 비교하여 본 결과 d-form이 β -cyclodextrin과 더 세게 complex를 형성하여 대개 l-form이 먼저 elution되었고, GC에서 chiralsil-val column과 반대 방향이었다.

참 고 문 헌

1. Stig G. Allen Mark, "Chromatographic Enantioseparation," 1st ed., John Wiley & Sons, 1988.
2. A. Holt; A.W. Javie; G. F. 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. Chromatography, 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. R. Lindner ; I. Hirschbock, J. of Liq. Chromatography, 1986, 9(243), 551-571.
9. H. Kuniwa ; Y. Baba ; T. Ishida ; H. Katoh, J. of Chromatography, 1989, 461, 397-405.
10. E. Armani ; L. Barazzoni ; A. Dossena ; R. Marchelli, J. of Chromatography, 1988, 441, 287-298.
11. B. Feibush ; M. J. Karger , J. of Chromatography, 1983, 282, 3-26.
12. W. Lindner ; J. N. Lepage ; G. Davies ; D. E. Seitz ; B. L. Karger, J. of Chromatography, 1979, 185, 323-344.
13. T. Takeuchi ; H. Asai ; D. Ishii, J. of Chromatography, 1986, 357, 409-415.

14. C. Gilson ; R. Leshem ; E. Grushka, Analytical Chemistry, 1980, 52, 1206-1209.
15. S. Lam, J. of Chromatography, 1986, 355, 157-164.
16. W. H. Pirkle ; D. W. House : J. M. Finn, J. of Chromatography, 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. O. 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 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. W. Saenger, Angew. Chem. Ed. Engl., 1980, 19, 344-362.
33. Daniel W. Armstrong; Thimothy J. Ward; R. D. Armstrong; T. E. Beesley, 232.
34. R. P. Rohrbach; L. J. Rodriguez; E. M. Eyring; J. F. Wojcik, J. of Phys. Chem., 1977, 81.
35. Marian Mikolajczyk; Jozef Drabowicz, J. Am. Chem. Soc., 1978, 100, 8.
36. Yoshio Inoue; T. Ikuda; Y. Miyata, J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 7393-7394.
37. S. Allenmark; B. Bomgren, J. of Chromatography, 1982, 252, 297.
38. K. R. Lindner, J. of Chromatography, 1980, 193, 308-310.
39. S. Hara; A. Dobashi; K. Kinoshita, J. of Chromatography, 1986, 371, 153-158.
40. A. Dobashi; Y. Dobashi; Tamami Oho; Shoji hara, J. of Chromatography, 1989, 461, 121-127.
41. K. R. Leimer; R. H. Rice; C. W. Gehrke, J. of Chromatography, 1977, 141, 355.
42. F. W. McLafferty; E. R. Lory, J. of Chromatography, 1981, 203, 109.
43. N. Oi; M. Horiba; H. Kitahara, J. of Chromatography, 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 Chromatography, 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. of Chromatography, 1983, 255, 67.
48. B. R. Larsen; F. G. West, J. of Chromatographic Science, 1981, 19, 257.
49. H. Umagat; P. Kucera; L. F. Wen, J. of Chromatography, 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. of Chromatography, 1974, 94, 113.
53. D. Lahadarios; I. M. Moodie; G. S. Shepard, J. of Chromatography, 1984, 310, 223.
54. M. Makita; S. Yamamoto; S. Kiyama, J. of Chromatography, 1982, 237, 279.
55. S. Lahadarios; R. A. Landown, 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. Galpern, Anal. Chem., 1968, 40, 2046.
60. R. W. Souter, J. of Chromatography, 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. Gilar; R. Charles; G. Fisher, J. of Chromatography, 1965, 17, 408.
68. S. Julia; J. M. Sans, J. of Chromatographic Science, 1979, 17, 651.
69. J. P. Kamerling; M. Duran, J. of Chromatography, 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. Geibrok, J. of Chromatography, 1978, 149, 214.
74. J. Hermansson; C. von Bahr, J. of Chromatography, 1980, 221, 109.
75. J. Goto; M. Hasegawa;S. Nakamura;K. Himada;T.Nambara, J. of
Chromatography, 1978, 152, 413.
76. P. Loew; W. S. Johnson, J.Am. Chem. Soc., 1971, 93, 3765.
77. M. Koreeda; G. Weiss; S. Nakanishi, J. Am. Chem. soc., 1973, 95, 239.
78. C.G.Scott; M.J. Petrin;T. Mccorcle,J. of Chromatography, 1976, 125,157.
79. B.J. Bergot; r.J. Anderson;D.A. Schooley;C.A. Henrick,J. of Chromatography,
1978, 155, 97.