

키랄킬레이트 이동상첨가법에 의한 답실아미노산의 광학이성질체 분리

李善行[†] · 吳岱變 · 邊聖九
경북대학교 사범대학 화학과
(1990. 2. 8 접수)

Optical Resolution of DABS-Amino Acids with Mobile Chiral Chelate Addition

Sun Haing Lee[†], Tae Sub Oh, and Sung-Gu Byun

Department of Chemistry, Teachers College, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
(Received February 8, 1990)

요 약. 역상 고성능 액체 크로마토그래피에 Cu(II)-L-Proline 킬레이트를 이동상에 첨가하여 답실아미노산(DABS-AA)을 광학분리했다. DABS-아미노산에 관한 머무름거동을 이동상의 아세토니트릴, 착물 및 완충용액의 농도와 pH에 따라 연구 검토했다. DABS-아미노산의 광학분리선택성은 이동상의 pH와 킬레이트의 농도가 증가하면 증가하나 유기용매의 농도에 따라 감소한다. 완충액의 농도에는 무관하다. DABS-아미노산과 구리 착물간의 리간드 교환반응의 입체효과에 따른 시스-트랜스 생성으로 분리메카니즘을 설명할 수 있다.

ABSTRACT. Optical isomers of DABS-amino acids have been separated in a reversed phase high performance liquid chromatography by adding Cu (II)-L-Proline chelate to the mobile phase. The retention behaviors for the DABS-amino acids are discussed in terms of pH of the mobile phase and the concentrations of acetonitrile, Cu (II) complex, and buffer. The selectivity of the optical isomers of DABS-amino acids increases with the pH of the mobile, and the concentration of the chelate, but decreases with concentration of the organic modifier. The concentration of buffer does not affect the optical separation selectivity. A separation mechanism is illustrated by cis and trans formation based on the steric effect of the ligand exchange reaction between DABS-amino acids and the copper chelate.

서 론

지금까지 아미노산 광학분리에 관한 연구가 활발히 진행되어 오고 있는데 초기에는 크로마토그래피¹⁻⁴에 의한 아미노산의 분리가 주된 방법이었으나 아미노산 자체의 고유한 비휘발성 때문에 최근에는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용한 아미노산의 광학이성질체를 분리하는데 관심이 집중되고 있으며 이는 리간드교환반응(LEC)⁵⁻⁸ 및 소수성 상호작용을 통해서 분리가 이루어지고 있는데 그 방법으로는 두 가지가 있다. 첫째는 고체 지지체에 키랄물질을

흡착 또는 결합시켜 분리하는 키랄정지상법(Chiral Stationary Phase Method)⁹⁻¹²이 있고 둘째는 이동상에 키랄물질을 첨가해서 분리하는 키랄이동상첨가법(Chiral Mobile Phase Addition Method)⁹⁻¹⁵이 있다. 키랄정지상법을 이용하여 라세미 화합물들을 성공적으로 분리한 예는 많으나 정지상의 합성이 어려운 반면 키랄이동상첨가법의 경우는 실험이 간편하고 키랄물질을 쉽게 변화시킬 수 있어 분리의 변화가 용이할 뿐만 아니라 키랄정지상법에 비해 컬럼 용량이 커서 사용에 이점이 있다.

키랄이동상첨가법을 이용 광학이성질체를 분리한 연구 보고로는 Karger와 공동연구자^{16,20}들이 키랄아민을 리간드로 한 금속 착물을 이동상에 넣어서 광학활성인 DNS-아미노산을 분리한 것이 있으며, Hare와 Gil-Av¹⁹는 Cu(II)-(Arginine)₂ 착물을 사용 C₁₈ column 상에서 D 및 L-DNS 아미노산을 분리하였다. 그 밖에도 여러 가지 리간드의 착물을 이동상에 첨가하여 아미노산 이성질체를 역상 액체 크로마토그래피로 분리하는데 성공했다.¹⁹⁻²³ 이들 대부분의 킬레이트의 중심금속으로서 Cu(II)를 주로 사용하여 광학이성질체의 용리순서, 리간드의 작용을 연구해 왔다.

이 분리메카니즘을 규명하기 위해 본 연구자들²⁴⁻²⁸은 이동상에 proline계 유도체의 리간드를 포함한 구리(II)킬레이트를 첨가하여 이성질체의 분리선택성(α), 용리순서, 머무름(k') 등을 조사해 왔다. 이들 연구는 D,L-아미노산의 용리가동용 SN₂성 리간드 교환반응이 입체효과로 설명할 수 있었다. 본 연구에서는 금속 킬레이트로 Cu(II)-(L-Proline)₂을 이동상의 첨가제로 사용하고 아미노산은 답실유도체화(dabsylation)시켜서 광학분리의 가능성을 조사하고 선행 연구된 DNS-아미노산과 비교해서 금속 킬레이트의 농도변화, 이동상의 유기용매 조성변화, pH 변화 및 완충용액 농도 변화에 따른 DABS-아미노산의 머무름 정도(k')와 분리 선택성(α), 용리순서를 고찰해 보고 분리메카니즘을 규명한다

실 험

기기장치. 액체 크로마토그래피로는 Beckman Model 331 QC isocratic system을 사용하였고 고압 펌프로는 Beckman 110B Solvet Delivery Module, 시료주입은 210A sample injection valve를 사용했다. 검출기로는 160 absorbance detector(436 nm)를 사용했고, 역상 컬럼으로는 Micro Pack MCH-5 NCap(15 cm×4 mm)을 사용하였으며, 이동상의 pH는 DMS PH Meter Model DP-215로 조정했다.

시 약. 시료로 사용한 아미노산은 D,L-serine(Ser), D,L-asparagine(Asn), D,L-threonine(Thr), D,L-alanine(Ala), D,L-leucine(Leu), D,L-tyrosine(Thr) D,L-valine(Val) 및 D,L-phenylalanine(Phe)을 사용했다. 위 사용한 시약인 Ser, Asn, Val, Tyr,

Ala은 Sigma(Saint, Louis, MO, U.S.A)제품이고, Thr, Met, Leu 및 Phe은 Yoneyama제품(오오시카, 일본)이다.

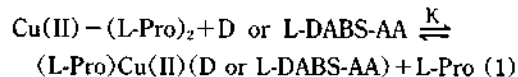
Dabsyl chloride(DABS-Cl)는 동인화학연구소(일본)에서 구입 사용했으며, 이동상으로 사용한 용매는 Baker제 HPLC용 acetonitrile(ACN)을 사용했다.

아미노산의 유도체화. 각 아미노산을 0.1 M 중탄산소오다(NaHCO₃) 용액 2 ml에 녹여 1×10⁻³ M 아미노산 용액으로 만들고 여기에 2×10⁻³ M DABS-Cl 용액(0.65 mg/ml ACN) 1 ml를 섞었다. 이 용기를 잘 밀봉한 다음 70 °C항온조(Water bath)에서 20분 가량 흔들어서 붉은색 침전물이 없어지고 용액이 오렌지색으로 변함에 따라 답실화 반응을 확인했다.^{29,30}

실험과정. 앞에서 얻은 DABS-아미노산(DABS-AA)을 직접 액체 크로마토그래피에 주사하였으며 이동상은 CuSO₄·6H₂O와 L-proline을 1 : 2 물비로 2×10⁻² M 아세트산암모늄(NH₄AC)에 녹이고 pH를 조정된 후 아세토니트릴(ACN) 조정을 맞추었다. 이동상은 Millipore 제품인 용매 정제기(Clarification Kit)를 사용하여 정제 및 탈기시킨 후 사용했으며 이동상의 흐름속도는 1.0 ml/min으로 고정하여 사용했다.

결과 및 고찰

본 실험에서 이동상으로 사용한 킬레이트 금속은 proline과 안정한 착물을 형성하는 Cu(II)를 사용했는데 Cu(II)는 DABS-아미노산과 반응 사각평면체의 착물을 형성한다³¹. 광학이성질체의 분리가 일어나기 위해서는 리간드 교환반응이 일어나는데 이를 도식화 해보면 다음과 같다.



식 (1)에서 알 수 있듯이 리간드교환반응의 결과 삼성분착물인 Cu(II)-(L-Pro) (DABS-AA)가 형성된다. 이 과정에서 평형상수 K는 아미노산의 종류에 따라 다르므로 선택적인 분리가 일어나게 된다. 또, 평형상수 K는 아미노산의 종류, 금속, 이동상에 넣어 준 리간드의 종류 등에 따라 다르고 이러한 리간드 교환반응을 설명키 위해 키랄 금속킬레이트의 리간

드의 L-proline을 사용하여 담실화시킨 DABS-아미노산을 역상 크로마토그래피에서 분리한 결과 Fig. 1과 같은 크로마토그램을 얻었다. 이 크로마토그램에서는 예상한 바와 같이 일반적으로 DABS-아미노산의 결사율이 클수록 정지상과의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)이 증가하여 머무름이

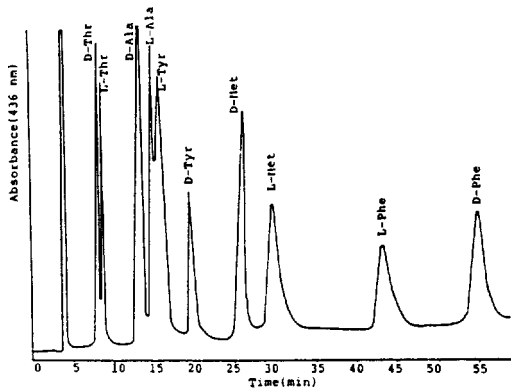


Fig. 1. Typical chromatogram of DABS-Amino Acids with the chiral mobile phase addition method. The mobile phase contains 27% acetonitrile and 73% $5 \times 10^{-3}M$ chelate solution containing $2 \times 10^{-2}M$ NH_4Ac buffer at pH 6.5. The chelate is $Cu(II)-(Pro)_2$.

증가하는 경향을 보여 주고 아미노산의 결사율에 친수성기가 포함되어 있을 경우 머무름도가 작아짐을 알 수 있다. 예를 들어 Tyr의 경우 알킬사슬이 bulky함에도 Phe보다 빨리 용리된 것은 알킬기내에 친수성기인 -OH기가 수용액과의 친화성이 크기 때문인 것 같다. 그리고 이들 Asn, Ser, Thr, Ala, Met 등은 용리순서가 D형이 먼저 용리되었고 Thr, Val, Leu, Phe은 L형이 먼저 용리되었다. 이와 같이 결과들에 대한 선행 연구된 메카니즘의 타당성을 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 수행했다. 아미노산 광학이성질체의 분리가 리간드 교환반응의 메카니즘을 따른다면 이동상의 pH를 증가시킬 때 DABS-아미노산의 카르복실산의 산해리 정도가 커져서 리간드 교환이 활발해 지고 따라서 머무름값과 선택성이 증가할 것으로 예상되나 이와는 달리 Table 1에서 보듯이 선택성(α)은 좋아졌으나 머무름값(k')은 감소하는 경향을 보였다. 이는 pH가 증가함에 따라 리간드인 L-Proline의 산해리가 더 커져서 배위결합의 활성이 더 커지기 때문에 DABS-아미노산과의 리간드 교환반응이 어려워져서 삼성분착물의 형성이 적어지기 때문이라고 추측할 수 있다^{24,25}. Ta-

Table 1. Capacity ratio(k') and selectivity(α) of DABS-AAs as a function of pH.

DABS-AA		pH 6.0		pH 6.5		pH 7.0		pH 7.5	
		k'	α	k_0	α	k_0	α	k_0	α
Asn	D	1.89	1.28	1.60	1.19	—	—	—	—
	L	2.43		1.90					
Ser	D	2.46	1.16	2.02	1.16	1.65	1.15	1.62	1.14
	L	2.86		2.35		1.91		1.85	
Thr	D	3.10	1.08	2.49	1.04	2.05	1.01	1.99	0.97
	L	3.35		2.59		2.07		1.93	
Ala	D	5.52	1.15	4.29	1.07	3.53	1.03	3.40	1.00
	L	6.35		4.60		3.64		3.40	
Tyr	D	7.71	0.94	6.59	0.86	5.61	0.81	5.49	0.76
	L	7.26		5.66		4.52		4.19	
Val	D	9.70	1.00	7.41	0.95	5.94	0.90	5.70	0.85
	L	9.80		7.07		5.34		4.87	
Met	D	11.19	1.17	9.25	1.05	7.68	1.02	7.52	0.95
	L	13.15		9.71		7.84		7.13	
Leu	D	19.21	1.10	14.56	0.97	11.69	0.91	11.21	0.87
	L	19.30		14.10		10.67		9.81	
Phe	D	24.52	1.00	20.44	1	17.23	0.82	16.73	0.77
	L	24.47		18.43		14.13		12.89	

27.5% Acetonitrile and 72.5% $Cu(II)-(Pro)_2$ chelate solution containing $2.0 \times 10^{-2}M$ NH_4Ac . Flow rate: 1.0 ml/min. Column: C_{18} column(Micro Pack MCH-5 NCap. 150×4 mm, 5 μ m). Visible Absorption at 436 nm. $k' = (t_R - t_0)/t_0$, $\alpha = k'_L/k'_D$.

Table 2. Capacity ratio (k') and selectivity (α) of DABS-AAs as a function of complex concentration

DABS-AA		$1.0 \times 10^{-3} M$		$5.0 \times 10^{-3} M$		$8.0 \times 10^{-3} M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Asn	D	—	—	1.88	1.03	3.05	1.34
	L	—	—	1.95	1.03	4.10	1.34
Ser	D	2.31	1.00	2.33	1.09	3.88	1.29
	L	2.33	1.00	2.54	1.09	5.03	1.29
Thr	D	2.84	1.0	2.88	1.00	4.39	1.12
	L	2.83	1.0	2.88	1.00	4.93	1.12
Ala	D	4.01	1.02	4.65	1.03	8.03	1.15
	L	4.11	1.02	4.77	1.03	9.21	1.15
Tyr	D	6.17	0.97	7.57	0.79	12.09	0.82
	L	5.97	0.97	6.01	0.79	9.93	0.82
Val	D	7.85	0.98	8.66	0.92	14.89	0.89
	L	7.67	0.98	8.00	0.92	13.20	0.89
Met	D	10.20	1.01	10.54	1.03	16.81	1.11
	L	10.36	1.01	10.89	1.03	18.72	1.11
Leu	D	15.23	0.98	16.83	0.94	29.76	0.85
	L	14.92	0.98	15.81	0.94	25.52	0.85
Phe	D	22.08	0.97	23.50	0.83	35.80	0.78
	L	21.51	0.97	19.31	0.83	27.98	0.78

The mobile phase contains 27% acetonitrile and 73% Cu(II)-(L-Pro)₂ chelate solution. The ammonium acetate buffer concentration was $2.0 \times 10^{-2} M$ at pH 6.5. Flow rate; 1.0 ml/min.

ble 2에서 보면 Cu(II) 착물의 농도를 증가시키면 리간드 교환반응을 삼성분착물이 더 많이 생겨서 예상 한 바와 같이 머무름값은 증가하고 선택성이 좋아졌다. Table 1과 2의 결과를 조사하면 역상 정지상에 대한 삼성분 착물의 머무름이 DABS-아미노산 자체의 머무름보다 더 크다는 것과 pH에 따라 선택성이 변하므로 이 광학분리의 입체적인 특성이 pH에 의존한다는 것을 알 수 있다. Table 3에서는 이동상의 유기용매 농도가 증가하면 이동상의 소수성이 증가하여 시료가 이동상과의 상호작용이 증대되어 머무름이 감소하며 따라서 선택성도 감소할 것으로 예상했으나 L형이 먼저 용리되는 Tyr, Val, Leu, Phe은 이에 일치하는 경향을 보인 반면 D형이 먼저 용리되는 Asn, Ser, Tyr, Ala은 머무름은 감소하나 분리 선택성은 증가하였다. 그 이유는 확실치 않으나 극성 결사슬과 용매의 쌍극자 상호작용때문인 것 같다. 용질과 용매의 수소 결합과 결사슬(side chain)의 길이가 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 이동상에 넣어 준 완충용액의 농도가 광학분리에 영향을 미치는 것을 조사해 본 결과 Table 4와 같이 큰 영향이 없었다. 완충용액의 농도가 증가함에

Table 3. Capacity ratio(k') and selectivity(α) of DABS-AAs as function of acetonitrile concentration

DABS-AA		32.5%		30.0%		27.5%		25.0%	
		k'	α	k'	α	k'	α	k'	α
Asn	D	—	—	—	—	1.55	1.44	—	—
	L	—	—	—	—	1.77	1.44	—	—
Ser	D	0.27	1.55	0.88	1.23	1.83	1.17	3.49	1.15
	L	0.42	1.55	1.09	1.23	2.15	1.17	4.0	1.15
Thr	D	0.42	1.16	1.11	1.08	2.25	1.03	4.33	1.00
	L	0.49	1.16	1.20	1.08	2.31	1.03	4.29	1.00
Ala	D	0.91	1.16	1.93	1.12	3.71	1.02	7.14	1.00
	L	1.06	1.16	2.17	1.12	3.79	1.02	7.08	1.00
Tyr	D	1.29	0.95	2.99	0.86	6.09	0.84	12.30	0.79
	L	1.22	0.95	2.58	0.86	5.12	0.84	9.80	0.79
Val	D	1.67	1.00	3.47	0.95	6.59	0.92	12.21	0.88
	L	1.68	1.00	3.29	0.95	6.05	0.92	10.75	0.88
Met	D	2.05	1.19	4.45	1.12	8.36	1.06	16.03	1.00
	L	2.45	1.19	4.99	1.12	8.83	1.06	1.96	1.00
Leu	D	3.27	1.00	6.77	0.98	0.98	0.95	0.95	0.90
	L	3.00	1.00	6.63	0.98	12.28	0.95	22.44	0.90
Phe	D	4.19	1.00	9.23	0.92	18.68	0.87	37.80	0.82
	L	4.21	1.00	8.45	0.92	16.29	0.87	30.99	0.82

The added chelate solution was $5 \times 10^{-3} M$ Cu(II)-(L-Pro)₂ containing $2 \times 10^{-2} M$ ammonium acetate at pH 6.0. Flow rate; 1.0 ml/min.

Table 4. Capacity ratio (k') and selectivity (α) of DABS-AAs as a function complex NH_4Ac concentration

DABS-AA		$1.0 \times 10^{-2} M$		$2.0 \times 10^{-2} M$		$3.0 \times 10^{-2} M$	
		k'	α	k'	α	k'	α
Asn	D	0.90	1.30	1.14	1.28	—	—
	L	1.17	1.46	1.46	—	—	—
Ser	D	1.24	1.16	1.55	1.13	1.85	1.12
	L	1.44	1.75	1.75	2.07	—	—
Thr	D	1.59	1.00	1.92	0.99	2.28	0.98
	L	1.58	1.90	1.90	2.24	—	—
Ala	D	2.80	1.04	3.23	1.00	3.81	1.00
	L	2.91	3.23	3.23	3.79	—	—
Tyr	D	4.26	0.79	5.09	0.79	6.03	0.79
	L	3.45	4.05	4.05	4.74	—	—
Val	D	4.61	0.88	5.43	0.88	6.29	0.88
	L	4.07	4.77	4.77	5.51	—	—
Met	D	6.09	1.01	7.03	1.00	8.28	1.01
	L	6.17	7.01	7.01	8.38	—	—
Leu	D	9.16	0.90	10.63	0.92	12.28	0.91
	L	8.27	9.79	9.79	11.20	—	—
Phe	D	13.13	0.84	15.61	0.83	18.35	0.82
	L	11.01	12.90	12.90	15.07	—	—

The mobile phase contains 27.5% acetonitrile and 72.5% Cu(II)-(L-Pro)_2 chelate solution at pH 7.0. Flow rate; 1.0 ml/min.

따라 머무름이 증가하는 것을 볼 수 있는데 이는 아세트산암모늄(NH_4Ac)이 이동상에 전체적인 이온분위기를 조성하여 이온의 강도를 크게 함으로써 용액의 소수성이 감소하여 C_{18} 컬럼에 삼성분 착물의 머무름이 커진 것으로 생각된다.

지금까지 DABS-아미노산의 분리현상에 대해서 고찰해 보았는데 이는 선행 연구에서 제안된 분리 메카니즘으로 설명이 가능하다²⁴⁻²⁸. 첫째로는 DABS-아미노산 유도체의 경우 질소원자에 결합된 Dabsyl기는 여러 가지 공간배치가 가능하다. Fig. 2에서 보듯이 DABS-아미노산의 알킬기와 담실기가 분자내 소수성 또는 친수성 상호작용을 할 수 있는 구조가 가장 우세할 것으로 생각된다. 둘째로 이동상에 넣어 준 Cu(II)-L-proline 은 사각 평면 구조를 형성하게 되며 *cis*형과 *trans*형 두 가지 구조가 모두 형성될 수 있으나 *cis*형은 고정된 오각고리가 사각 평면에서 다른 방향에 존재하므로 정지상과의 상호작용이 크며 오각고리가 같은 방향에 존재하는 *trans*형 보다는 SN-2 성 리간드교환반응에 입체 선

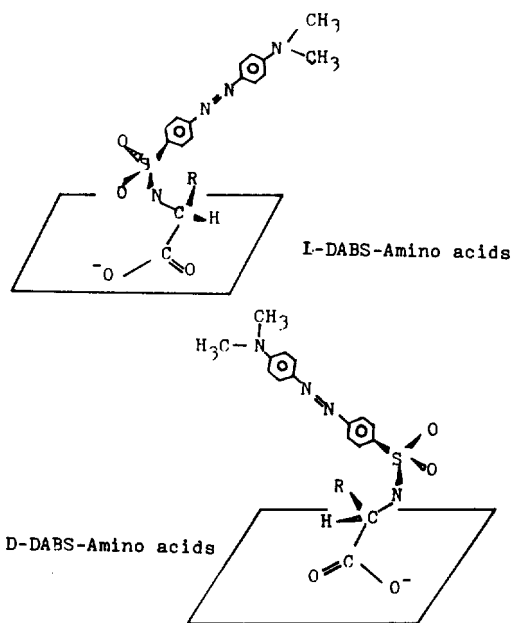


Fig. 2. The conformation of the *D, L*-DABS-Amino acids in the mobile phase.

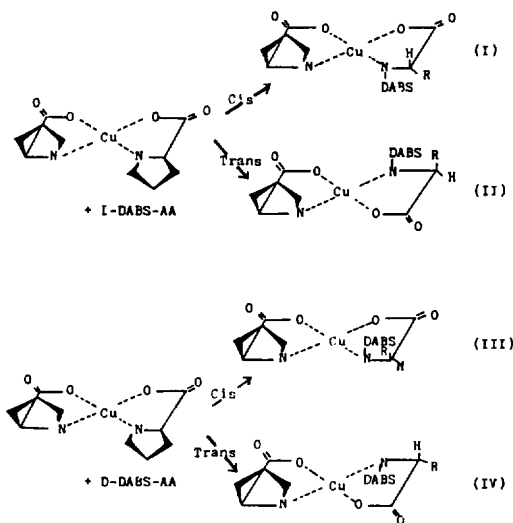


Fig. 3. A proposed ligand exchange reaction for the system containing the Cu(II)-(L-Pro)_2 in the mobile phase.

택성이 우세할 것이다²⁴. 세째는 Fig. 3에서 보듯이 리간드 교환반응은 associative SN-2 반응성을 띠며 Ser, Thr 및 Ala의 경우는 그들의 결사슬이 짧거나 친수성을 띠기 때문에 Fig. 2의 conformation이 우세치 않아 L-형이 쉽게 이성분 착물에 공격하여

삼성분 착물을 만들 수 있으나 생성된 삼성분 착물과 C₁₈정자상과의 소수성 상호작용의 차이로 분리가 가능한 것 같다. 반면에 Tyr, Val, Leu, Phe의 경우는 아미노산의 결사슬에 베헨고리가 있거나 bulky한 알킬기가 있기 때문에 광학이성질체의 용리순서가 역전된다. 그것은 Fig. 3에서와 같이 이성분 착물에 L- 및 D-DABS-아미노산이 bulky한 결사슬로 SN-2 반응에서 cis보다 trans 삼성분 착물생성이 용이하며 또 이 D-DABS-아미노산의 삼성분 착물이 C₁₈컬럼과 소수성 상호작용이 크기 때문에 오해 머무는 것 같다. 그러나 이 경우 DABS-아미노산은 이성분 착물의 프로린고리와 bulky한 결사슬의 입체장애로 cis형 삼성분 착물의 생성이 어려운 것으로 생각된다. 이에 대한 증거로 pH가 높아지면 머무름이 감소하나 분리선택성이 증가하는 것으로 알 수 있다. 전자 (Ser, Thr 및 Ala)의 경우는 pH가 증가함에 따라 trans형과 cis형이 감소하나 dissociative SN-2반응에서 associative SN-2로 변하여 trans형이 상대적으로 비율이 커져서 분리선택성이 감소하나 후자 (Tyr, Val, Leu 및 Phe)인 경우도 상대적으로 trans형의 비율이 증가하여 분리선택성도 pH에 따라 계속 증가하는 것을 알 수 있다.

결 론

역상 크로마토그래피로 키랄이동상첨가법을 이용하여 dabsyl-아미노산 광학이성질체를 분리하였으며 라세미화가 되지 않고 DNS-아미노산의 경우와 같이 이동상의 pH증가에 따라 머무름값은 감소되나 선택성은 좋아졌고, 착물농도 증가에 따라서 머무름 및 선택성이 증가하였으며 완충용액도 증가에 대해서는 머무름값은 증가하였으나 선택성에는 거의 변화가 없었다. 그리고 유기용매 조성이 증가함에 따라 머무름값은 감소하나 선택성은 아미노산의 작용기에 따라서 증가하거나 감소했다. DNS-아미노산 유도체와 비교해 볼 때 가시광선으로 흡수, 검출이 가능하며 uv-vis 흡수 검출기를 사용시 감도가 더 좋았고 특히 이동상의 영향이 적었으며 상온에서 보관이 용이한 장점을 보였다. 그리고 답실 유도체화된 아미노산의 광학이성질체의 분리 거동도 선행 연구의 입체 선택적인 cis-trans 리간드 교환반응으로 그 메커니즘의 설명이 가능했다.

이 연구는 한국과학재단의 연구비 지원과 경북대학교의 학술재단의 도움으로 이루어졌으며 이에 깊은 감사를 드린다.

인 용 문 헌

1. S. Weinstein, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, **126**, 97 (1976).
2. U. Beittler and B. Feibush, *J. Chromatogr.* **123**, 149 (1976).
3. H. Frank, G. J. Nicholson, and E. Bayer, *J. Chromatogr.* **167**, 187 (1979).
4. R. Charles, U. Beittler, B. Feibush, and E. Gil-Av, *J. Chromatogr.* **112**, 121 (1975).
5. V. A. Davankav and A. V. Semechkin, *J. Chromatogr.* **123**, 149 (1979).
6. S. Lam, F. Chow and A. Karmen, *J. Chromatogr.* **199**, 295 (1980).
7. C. Gilon, R. Leshem, Y. Tapuhi and E. Grushka, *J. Amer. Chem. Soc.* **101**, 7612 (1979).
8. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *J. Chromatogr.* **203**, 365 (1981).
9. Y. Yuki, K. Saigo, K. Tachibana, and M. Hasegawa, *Chem. Soc. Jpn.* 1347 (1986).
10. H. Berndt and G. Kruger, *J. Chromatogr.* **348**, 275 (1985).
11. E. Grushka and R. Leshem and C. Gilon, *J. Chromatogr.* **255**, 41 (1983).
12. V. A. Davankov and A. V. Semechkin, *J. Chromatogr.* **141**, 131 (1977).
13. T. Takeuchi, H. Asai, Y. Hashimoto, K. Watanabe, and D. Ishii, *J. Chromatogr.* **331**, 99 (1985).
14. Y. Papuhi, N. Miller and B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **202**, 325 (1981).
15. S. Lam, *J. Chromatogr.* **234**, 485 (1982).
16. J. N. Lepage, W. Lindner, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *Anal. Chem.* **51**, 433 (1979).
17. W. Lindner, J. N. Lepage, G. Davies, D. E. Seitz, and B. L. Karger, *J. Chromatogr.* **185**, 323 (1979).
18. S. Lam, F. Chow, and A. Karmen, *J. Chromatogr.* **199**, 295 (1980).
19. E. Gil-Av, A. Tishbee, and P. E. Hare, *J. Amer. Chem. Soc.* **102**, 5115 (1980).
20. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *Anal. Chem.* **52**, 1206 (1980).

21. I. D. Hay, T. M. Annesley, N. S. Jiang, and C. A. Gorman, *J. Chromatogr.* **203**, 365 (1981).
22. C. Gilon, R. Leshem, and E. Grushka, *J. Chromatogr.* **203**, 365-375 (1981).
23. A. A. Kurganov and V. A. Davankov, *J. Chromatogr.* **218**, 559-567 (1981).
24. S. H. Lee, K. S. Park, J. W. Ryu, *Bull. Korean Chem. Soc.* **7**(1), 45 (1986).
25. S. H. Lee, T. S. Oh, and B. E. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* **9**(6), 341 (1988).
26. S. H. Lee, T. S. Oh, and K. S. Park, *J. Korean Chem. Soc.* **30**(2), 216 (1986).
27. S. H. Lee, T. S. Oh, and Y. C. Lee, 3rd Korean Japan Joint Symp. on Anal. Chem. **137** (1989).
28. S. H. Lee, T. S. Oh, and S. H. Bak, *Bull. Korean Chem. Soc.* **10**(6), 491 (1989).
29. J. K. Lin, J. Y. Chang, *Anal. Chem.* **47**(9), 1634 (1975).
30. R. Kencht, J. Y. Chang, *Anal. Chem.* **58**, 2375 (1986).
31. M. Itabashi and K. Itoh, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **53**, 3131 (1980).