

TBDMS 유도체로서 수용액 시료중의 유기산 미량분석 연구

金京禮[†] ·金正漢* ·朴炯國*

성균관대학교 약학대학 제약학과

*연세대학교 공과대학 식품공학과

(1990. 2. 24 접수)

Trace Analysis as TBDMS Derivatives of Organic Acids in Aqueous Samples

Kyoung-Rae Kim[†], Jung-Han Kim*, and Hyoung-Kook Park*

[†]Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

College of Pharmacy, Sungkyunkwon University, Suwon 440-746, Korea

(Received February 24, 1990)

요 약. 생화학적으로 주요한 유기산들을 신속히 분석 확인할 수 있는 효율적인 가스 크로마토그래피 분석법을 개발하였다. 본 방법에서는 고정흡착제로서 Chromosorb P와 용출용매로서 diethyl ether를 사용하여 수용성 시료로부터 유기산을 고체상 추출한 후 triethylamine으로 처리하였다. 생성된 유기산들의 triethylammonium염을 직접 *tert*-butyldimethylsilyl 유도체로 전환시킨 후 극성이 다른 DB-5와 DB-1701 두 capillary column 분석 후 측정된 각 유기산들의 retention index (RI)와 area ratio (AR)값을 가지고 컴퓨터 RI library 조사와 AR 비교를 하였을 때 신속히 유기산을 동정할 수 있었다. 본 방법은 다양한 복합 시료들의 유기산 분석을 하는데 응용될 수 있을 것이다.

ABSTRACT. An efficient gas chromatographic method is described to be used routinely for the rapid profiling and identification of biochemically important organic acids. It involves the solid-phase extraction of organic acids from aqueous samples using Chromosorb P as the solid sorbent and diethyl ether as the eluting solvent, with subsequent triethylamine treatment. The resulting triethylammonium salts of acids were directly converted to volatile *tert*-butyldimethylsilyl derivatives, which were simultaneously analyzed by two capillary columns of different polarity, DB-5 and DB-1701, under the identical temperature programming condition. The retention index (RI) and area ratio (AR) values of each peak measured on DB-5 and DB-1701 enabled rapid identification of acids by computer RI library search and AR comparison. The application of the present method to the organic acid profiling of various complex samples is demonstrated.

서 론

식물, 미생물, 동물 등의 대사산물이나 이를 원료로한 다양한 생산제품에서 발견되는 유기산은 생물학적, 생리학적 대사나 발효과정의 중요한 지표가 되고 있다. 이들 유기산은 구조적으로 매우 다양하

므로, 탄소수가 적은 휘발성 지방산과 여러 기능기를 가진 비휘발성 유기산의 동시분석이 용이치 않다. 유기산을 분석하기 위해서는 복합 혼합물체로부터 유기산만을 선택적으로 분리, 농축하는 과정이 선행되어야 한다. 이를 위해서 종래에는 액체-액체 추

출법¹²이나 음이온 교환법³을 사용하여 왔으나 이들은 많은 용매의 사용을 요구하고 농축과정 중에서 휘발성 유기산의 손실이나, 용매자체의 불순물에 의해서 시료가 오염될 위험이 높다. 이러한 문제를 해결하기 위해서 최근에 개발되어 액체-액체 추출법을 대체하고 있는 고체상추출법(solid-phase extraction; SPE)⁴을 유기산의 효과적인 분리, 농축에 응용한 예가 보고되고 있다⁵⁻⁸.

본 실험에서는 이미 유기산만을 선택적으로 분리, 농축하기 위하여 친수성 흡착제인 Chromosorb P를 고정 흡착제로, diethyl ether를 용출용매로 사용한 두 단계의 고체상추출법을 보고하였다^{7,8}.

유기산을 효과적으로 분리, 농축하였다 하더라도 이를 gas chromatograph (GC)로 분석하기 위해서는 유기산의 carboxyl기를 적당한 비극성 휘발성기능기로 전환 해야한다. 일반적으로 유기산을 alkyl ester나 trimethylsilyl (TMS) ester의 형태로 분석하고 있다^{9,10}. 그러나 alkyl ester의 경우 탄소수가 적은 유기산 중에서 formic acid나 acetic acid의 휘발성이 오히려 더 증가되므로 GC에 의한 분석을 어렵게 한다. 유기산의 TMS 유도체의 경우에는 수분에 너무 약해 시료 보관의 어려움이 지적되어왔다. 그러나 최근 유기산의 GC 분석에 이용되는 tert-butylidimethylsilyl (TBDMS) ester¹¹는 TMS 유도체보다 수분에 대한 안정도가 10,000배나 높은 장점과 함께 휘발성 및 비휘발성 유기산의 동시분석도 가능케한다^{11,12,13}. 또한 GC 분리도가 증가하므로 FID에서의 감응이 증가되고^{11,13} mass spectra에 (M-57)의 특징적 peak가 나오는 장점이 있다¹³.

한편, 휘발성 유기산의 경우에는 고체상추출법을 적용하여 분리해도 용출 및 농축과정 휘발되어 손실 위험이 높다. 손실 문제를 해결하기 위해서 본 연구실에서는 용출된 유기산을 triethylamine으로 처리하여 비휘발성 triethylammonium염으로 만든 후, 반응성이 높은 silylation 시약인 N-methyl-N-tert-butylidimethylsilyl(trifluoroacetamide) (MTBSTFA)와 직접 반응시켜서 유기산을 TBDMS 유도체로 전환시키고 GC에 의해 분석하는 방법을 보고한 바 있다¹².

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)법의 도움없이 유기산을 동정하기 위해서는, 유

기산 표준물질의 retention index (RI)의 reference library를 작성하고 각 peak의 RI 값과 대조하여 동정하는 방법을 사용할 수 있다¹⁴. 이와 같은 RI 동정법은 최소한 극성이 서로 다른 둘 이상의 column을 사용할 때 더욱 신뢰도가 증가한다. 그러나 두 column만을 사용할 경우에는 RI value set에 대해서 RI 동정법을 적용하여 일차적으로 각 peak를 동정하고, 두 column에서의 area ratio (AR)를 비교하여 peak들을 재확인 할 수 있음을 보고하였다¹⁵. 이를 위하여 시료를 차별분할없이 column내로 주입하는 splitless mode로 injection 해야하며¹⁶, dual-capillary column chromatography를 이용할 때 분석시간도 줄일 수 있고 injection error에 따른 오차를 방지할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서는 91개의 생화학적으로 주요한 유기산들을 TBDMS 유도체로 만들어 splitless mode로 주입시킨 후 dual-capillary column chromatography를 사용하여 동시분석하고 각 유기산의 RI set를 구하여 RI library를 작성하여 컴퓨터내에 내장하였다. 수용액 시료로부터 이미 보고한 고체상추출법과 유도체합성법을 적용하여¹³ 유기산을 분리, 농축하고 TBDMS 유도체로 만들어 dual-capillary column GC를 사용하여 동시분석을 수행하였다. 또한 computer를 이용하여 RI values를 구하고 RI library를 검색하여 각 peak를 동정하고 area ratio를 비교하여 이를 재확인하였다. 본 방법을 유기산의 신속히 정성분석하는 방법으로서 이용될 수 있음을 조사하고자 다양한 수용액 시료에 적용하였다.

실 험

시약 및 시료. 본 실험에서 사용한 시약들은 모두 특급 또는 시약급이었다. 21개의 포화 지방산은 미국의 Analabs사와 Altech사로부터 구입하였으며, 나머지 유기산들은 Sigma사와 Aldrich사로부터 구입하였다. Silylation 시약인 MTBSTFA는 미국의 Pierce사로부터 구입하여 사용하였으며 isooctane, 황산, 소금, sodium bicarbonate는 일본의 Junsei사의 것을 사용하였다. TEA는 analytical grade를 KOH로 건조하여 사용하였으며 Chromosorb P (AW, 80~100 mesh)는 미국의 Supelco사의

시약급이었다. Wine과 Cheese는 시중에서 구입하였고 미생물 배양액(Actinomycetes)은 KAIST에서 배양한 배양액을 사용하였다.

기기 및 분석조건. 사용한 기기는 HP-5890A gas chromatograph와 HP-3392A integrator 그리고 HP-5895A GC workstation 이었으며 column은 미국 J&W사의 DB-5와 DB-1701 fused silica capillary column (30 m×0.25 mm I.D., df 0.25 μm)을 사용하였고, guard column으로서는 Supelco사의 deactivated fused silica tubing (1 m×0.25 mm I.D.)을 사용하였다.

Dual-capillary column GC를 위해서 GC의 inlet에 guard column을 연결하고, 두 개의 column을 guard column에 동시에 연결하기 위해 미국 Unimetrics사의 Chromfit Y splitter (0.25 mm I.D.)를 사용하였다.

두 column의 온도는 60 °C에서 2분간 유지한 후 분당 4 °C로 상승시켜 280 °C에서 30분간 유지하였다. Flame ionization detector (FID)의 온도는 300 °C이었고, injection 방법은 splitless mode를 사용하였다. 이 때 injection port의 온도는 220 °C였으며 purge delay time은 42초로 조절하였다. Column내의 운반 기체인 질소가스의 유속은 0.85~0.87 ml/min (DB-5), 0.88~0.90 ml/min (DB-1701)이었다. 각 시료의 주입량은 0.3~0.4 μl이었고 분리된 peak들의 RI 값을 구하기 위해서 0.4 μl의 포화탄화수소 표준용액(isooctane에 100 ppm의 C₈~C₃₀ 함유)을 시료와 함께 주입하였다. Area ratio를 계산하기 위해서 내부 표준물질로서 methyl linoleate를 사용하였다.

모든 GC 분석은 세번 반복하였다.

실험방법. 각 유기산의 표준원액은 이미 보고한 대로 조제하고¹³ 이 원액들을 30배 희석하여 유기산 표준용액으로 사용하였다. 표준용액 1 ml씩 취하여 MTBSTFA (20 μl)와 isooctane (60 μl)을 가하고 60 °C에서 5시간 가열 반응시켜 유도체화 하였다.

수용성 시료인 경우에는(wine, cheese solution, 미생물 배양액) 이미 보고한 방법¹³에 의해서 각 시료를 sodium bicarbonate로 포화시킨 후 diethyl ether로 추출하여 ether층을 버리고 수용액층에서 1 ml를 취하였다. 이것을 진한 황산(4방울)으로 산성화시키고 (pH 1) sodium chloride로 포화시킨 후 Ch-

romosorb P column에 흡착시켰다. Diethyl ether 4 ml를 통과시켜 얻어진 ether 용출액을 TEA (20 μl)와 혼합시킨 후 건조시키고(무수 magnesium sulfate) 농축시킨 후 위에 언급한 방법에 따라 유도체화 시켰다.

시료와 같이 주입된 포화탄화수소를 reference peak로 하여 GC Chemstation BASIC program에 의해 각 시료의 peak들의 RI values를 구하고, RI library searching을 통하여 동정하였다. 동정된 각 peak와 내부표준물질과의 area ratio를 각 column에서 구하고 해당되는 peak들의 area ratio를 비교하여 재확인 하였다. 이때 허용 최대상대오차는 10%로 하였다.

결과 및 고찰

Dual-Capillary Column System. 시료를 DB-5와 DB-1701 dual-column에 동시 분석할 수 있도록 column과 내경이 같은 deactivated fused silica tubing 두 끝을 injector와 세입구를 가진 Y자형 splitter에 연결한 후 두 column을 splitter 두 입구에 각각 연결하였다. 최근에 시판되기 시작한 Y splitter는 별 다른 도구없이 손쉽게 column들을 연결할 수 있도록 한다. 연결 후 200 °C 이상 가열되면 column들의 polyimide coating이 splitter 내에서 더욱 단단히 고정 되도록 하여 기체누출이 없도록 해준다.

주입된 시료는 silica tubing을 통과한 후 Y splitter에서 두 column내로 분할된다. DB-5와 DB-1701 column의 규격을(내경, 길이, 고정상의 두께) 동일 하도록 정확히 조절할 수가 없으므로 주입된 시료가 1:1 대신 2:3 비율로 분할되었다. 그러나 시료성분들과 겹치지 않고 분리되는 methyl linoleate를 내부표준물질로 사용하였기 때문에 area ratio에는 문제가 되지 않았다.

이미 보고한 바와 같이¹⁵ Y splitter와 1 m 길이나 되는 silica tubing이 dead volume 영향을 거의 주지 않으므로 두 column의 분리능이 저하되지 않았다. Silica tubing은 시료를 splitless injection 할 때 용매효과를 증강시키는 retention gap¹⁷ 역할도 하며 또한 고가의 capillary column들이 오염되는 성능이 손상되는 것로부터 보호하는 guard column 역할을

하는 장점을 가지고 있다.

Splitless injection 할 때 용매효과를 충분히 얻기 위해서는 시료주입량이 0.5 μ l 이상이어야 한다¹⁶. 또 화탄화수소 표준용액과 동시 주입하지 않는 경우에는 용매로 사용된 isooctane 0.4~0.5 μ l를 시료와 같이

주입하였다.

유기산 TBDMS 유도체의 RI Library 작성. RI searching을 이용한 유기산의 동정을 위해서 Table 1과 같은 91개의 생화학적으로 주요한 TBDMS 유도체의 RI library를 작성하였다. 각각의 RI 값은 3회

Table 1. Retention index values of organic acids as TBDMS derivatives

No.	Acid	DB-5	BD-1701	No.	Acid	DB-5	DB-1701
1	Formic	877.16	*	47	Phenyl lactic	2047.18	2127.59
2	Acetic	930.40	980.89	48	Pimelic	2069.96	2173.64
3	Propionic	1017.47	1066.05	49	Myristoleic	2077.65	2139.43
4	Isobutyric	1056.47	1125.26	50	Myristic	2086.96	2139.24
5	Butyric	1102.70	1148.84	51	Hippuric	2095.38	2366.59
6	Isovaleric	1150.42	1193.93	52	<i>p</i> -OH phenyl acetic	2113.80	2211.29
7	Valeric	1195.72	1243.17	53	<i>p</i> -OH benzoic	2121.81	2218.81
8	Caproic	1291.00	1339.10	54	Phthalic	2142.93	2274.84
9	Enanthic	1388.11	1436.72	55	Ketopimelic	2143.57	2218.73
10	Caprylic	1485.86	1535.03	56	Suberic	2171.23	2282.36
11	Benzoic	14.86.42	1575.25	57	Malic	2171.56	2239.89
12	Lactic	1490.27	1532.78	58	Pentadecanoic	2186.25	2240.30
13	Glycolic	1506.38	1563.58	59	Oxalacetic	2298.50	2376.41
14	Phenyl acetic	1524.76	1622.50	60	4-Oh-3-methoxy phenyl acetic	2248.78	2365.43
15	Pyruvic	1534.67	1576.87	61	Vanillic	2258.97	2370.38
16	Oxalic	1548.59	1643.99	62	Palmitoleic	2270.65	2334.03
17	Pelargonic	1584.67	1634.40	63	Azelaic	2275.33	2382.72
18	α -OH isovaleric	1605.12	1637.75	64	Palmitic	2288.76	2342.38
19	α -OH valeric	1620.77	1656.45	65	Sebacic	2376.56	2487.67
20	Malonic	1640.17	1727.90	66	Tartaric	2375.81	2461.65
21	α -OH isocaproic	1652.89	1685.91	67	Margaric	2388.44	2443.83
22	Methyl malonic	1658.20	1737.12	68	<i>cis</i> -Aconitic	2388.78	2495.21
23	Capric	1684.17	1734.50	69	Syringic	2392.54	2515.94
24	α -OH caproic	1701.10	1734.91	70	γ -Resorcylic	2410.68	2484.80
25	Ethyl malonic	1721.89	1797.16	71	<i>p</i> -OH mandelic	2427.15	2498.52
26	Succinic	1759.14	1851.82	72	Gentisic	2449.71	2518.99
27	Methylsuccinic	1769.16	1936.25	73	Linoleic	2463.33	2547.45
28	Maleic	1769.54	1831.24	74	Oleic	2466.71	2527.55
29	Phenyl propiolic	1774.87	1903.44	75	Petroselinic	2466.71	2531.99
30	Citraconic	1783.78	1846.37	76	Linolenic	2471.87	2557.15
31	Undecanoic	1783.80	1834.73	77	Elaidic	2473.28	2544.39
32	Fumaric	1786.92	1875.63	78	β -Resorcylic	2484.37	2562.50
33	<i>l</i> -Cinnamic	1788.48	1911.54	79	α -Resorcylic	2484.56	2562.64
34	Itaconic	1790.70	1879.99	80	Stearic	2490.47	2545.82
35	Glutaric	1857.03	1956.56	81	Homogentisic	2512.37	2594.62
36	6-Phenyl valeric	1871.21	1980.80	82	Protocatechuic	2537.68	2620.72
37	3-Methyl glutaric	1872.50	1861.54	83	Dodecanedioic	2580.05	2788.74
38	Lauric	1883.92	1935.42	84	<i>p</i> -OH phenyl lactic	2602.01	2675.39
39	Mandelic	1902.72	1902.42	85	11-Eicosenoic	2621.49	2711.81
40	<i>p</i> -Aminobenzoic	1907.57	2121.47	86	Citric	2626.39	2681.20
41	Phenylpyruic	1932.56	2020.93	87	rachidonic	2633.32	2731.81
42	3,4-dimethoxy benzoic	1958.26	2161.46	88	Ascorbic	2642.35	2986.49
43	Adipic	1966.68	2073.12	89	Arachidic	2684.89	2745.86
44	Salicylic	1970.53	2047.69	90	Erucic	2817.26	2923.77
45	Tridecanoic	1984.44	2037.51	91	Docasahexaenoic	2864.43	2933.65
46	3-Methyl adipic	1990.88	2092.50				

*Not calculable due to co-elution with a reagent peak. DB-5(30m \times 0.25mm I.D., 0.25 μ m) and DB-1701(30m \times 0.5mm I.D., 0.25 μ m) at 60 $^{\circ}$ C(2min) to 280 $^{\circ}$ C at 4 $^{\circ}$ C/min.

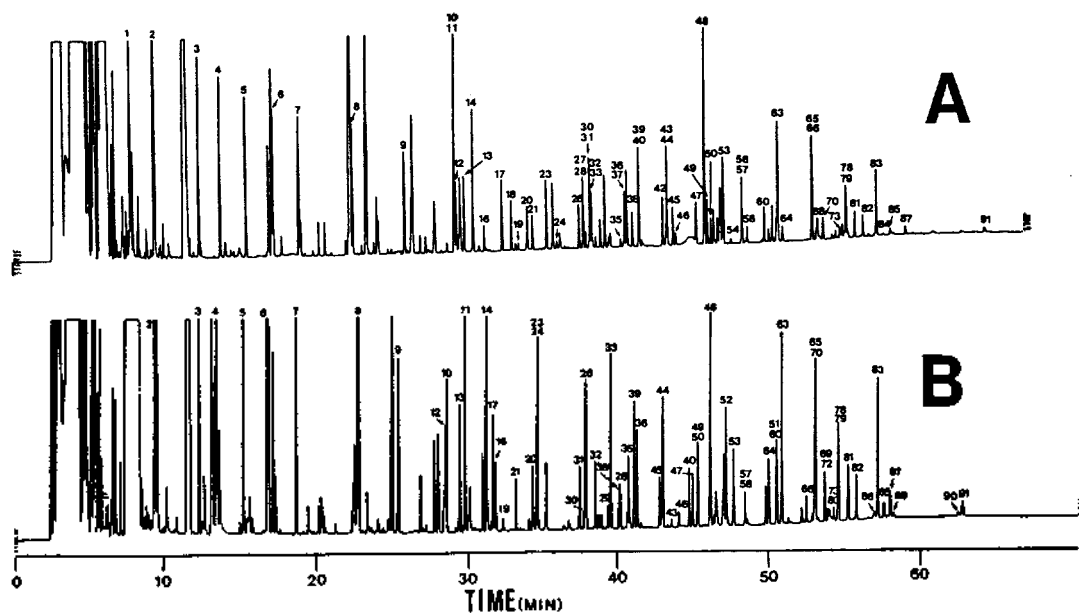


Fig. 1. DB-5(A) and DB-1701(B) dual-capillary gas chromatographic separation of a mixture of 91 organic acids standards as *tert*-butylidimethylsilyl derivatives. Peak numbers correspond to the numbers in Table 1 and GC conditions are in the text.

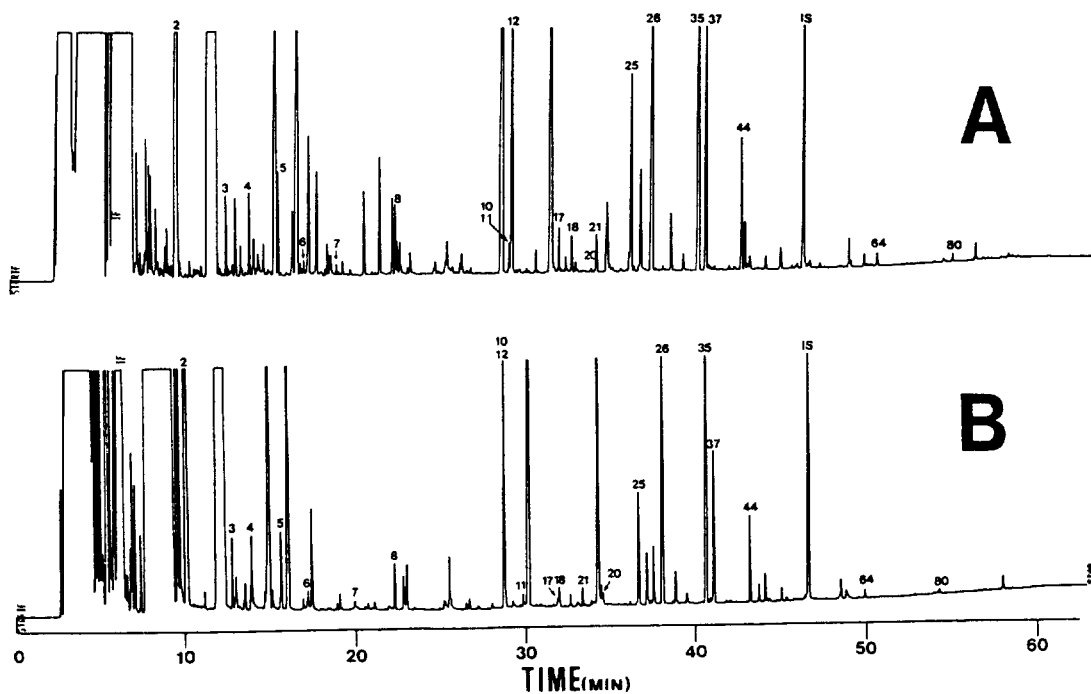


Fig. 2. DB-5(A) and DB-1701(B) organic acids profiles of wine. Peak numbers correspond to the numbers in Table 1 and GC conditions are in the text.

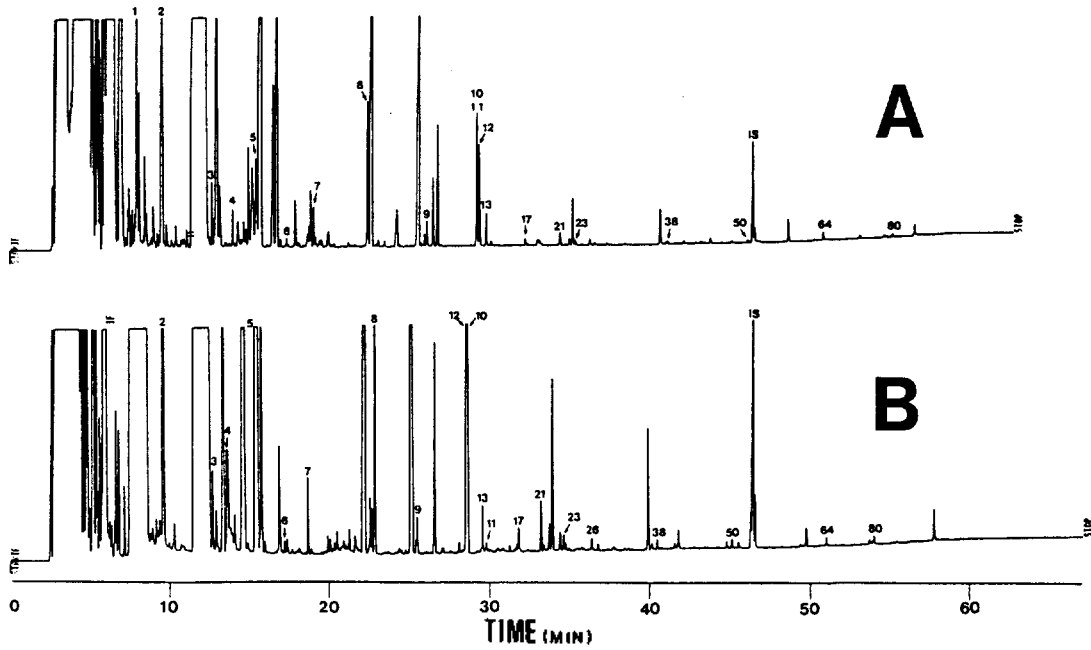


Fig. 3. DB-5(A) and DB-1701(B) organic acids profiles of cheese solution. Peak numbers correspond to the numbers in Table 1 and GC conditions are in the text.

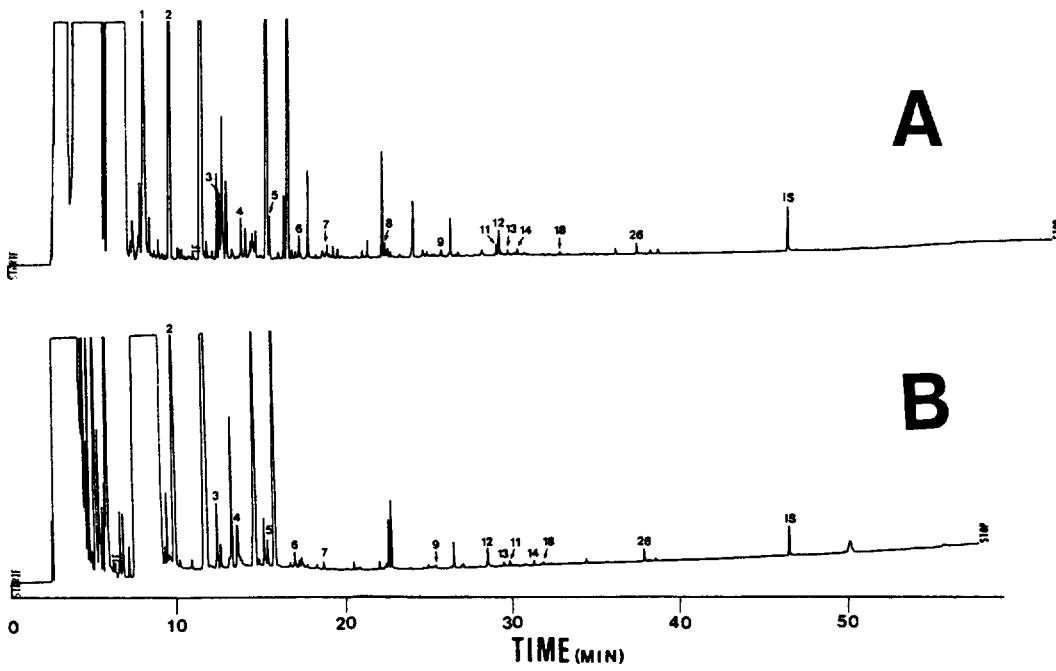


Fig. 4. DB-5(A) and DB-1701(B) organic acids profiles of microbial product. Peak numbers correspond to the numbers in Table 1 and GC conditions are in the text.

반복 실험하여 그 값들의 평균값으로 하였으며 이때 표준편차가 ± 0.5 이하로서 split injection 때와 비교하여 별차이 없이 높은 재현성을 나타내었다. 이때 운반기체의 유속, 검출기의 감도, 시료주입량, 온도 programming 조건을 일정하도록 조절하였다. Fig. 1의 전체 유기산들의 TBDMS 유도체의 dual-column GC profile을 서로 비교할 때 부분의 유기산들의 elution order는 바뀌지 않으나 몇몇 유기산들의 elution order가 바뀌었고 α -와 β -resorcylic acid는 두 column에서 서로 분리되지 않았다.

수용액 시료에서의 유기산의 분석. 본 방법을 적용하여 수용액 시료(wine, cheese solution, 미생물 배양액)들의 유기산을 분석하였다. 각 시료로부터 비휘발성 유기산을 기존의 partition에 의한 추출법보다¹⁸ 손실을 줄여 선택적으로 분리, 농축해낼 수 있었다. Fig. 2~4는 각 시료들의 dual-column chromatogram들을 보여주고 있다. 각 시료들에 대해서 RI 계산 및 library searching, area ratio 계산 및 area ratio 비교를 하였으며 그 분석 결과는 Table 2~4에

Table 2. Organic acids in wine

Acid	RI		Amount (Y/N)
	DB-5	DB-1701	
Acetic	930.21	980.32	N
Propionic	1017.35	1066.14	Y
Isobutyric	1056.20	1124.96	Y
Butyric	1102.45	1149.02	Y
Isovaleric	1150.45	1193.87	Y
Valeric	1195.60	1242.99	Y
Caproic	1291.04	1339.02	Y
Caprylic	1485.90	1533.02	N
Benzoic	1485.90	1575.40	N
Lactic	1490.01	1533.02	N
Pelargonic	1584.55	1634.45	Y
α -OH-isovaleric	162.74	1656.55	Y
Malonic	1640.12	1727.87	Y
α -OH-isocaproic	1652.77	1686.02	Y
Ethyl malonic	1721.77	1797.05	Y
Succinic	1759.07	1851.92	Y
Glutaric	1857.10	1956.42	Y
3-methylglutaric	1872.61	1961.02	Y
Salicylic	1970.67	2047.25	Y
Palmitic	2288.74	2342.45	Y
Stearic	2490.35	2545.77	Y

실려있다. Area ratio를 비교할 때 상대오차가 10% 이하는 Y, 10% 이상인 경우에는 N으로 표시 하였다. Wine과 cheese solution에서는 각각 21개의 유기산

Table 3. Organic acids in cheese

Acid	RI		Amount (Y/N)
	DB-5	DB-1701	
Formic	877.05		N
Acetic	930.37	980.78	N
Propionic	1017.30	1066.10	Y
Isobutyric	1056.44	1125.30	Y
Butyric	1102.56	1148.54	N
Isovaleric	1150.33	1193.87	Y
Valeric	1195.70	1243.22	Y
Caproic	1290.92	1339.21	Y
Enanthic	1388.20	1436.65	Y
Caprylic	1485.95	1533.02	N
Benzoic	1485.95	1575.32	N
Lactic	1490.30	1533.02	N
Glycolic	1506.41	1563.62	Y
Pelargonic	1584.56	1634.34	Y
α -OH-isocaproic	1653.94	1685.88	Y
Capric	1684.20	1734.47	Y
Succinic	1759.20	1851.74	Y
Lauric	1883.99	1935.40	Y
Myristic	2086.89	2139.20	Y
Palmitic	2288.70	2342.42	Y
Stearic	2490.42	2545.90	Y

Table 4. Organic acids in microbial product

Acid	RI		Amount (Y/N)
	DB-5	DB-1701	
Formic	876.84		N
Acetic	930.37	980.69	N
Propionic	1017.43	1065.99	Y
Isobutyric	1056.50	1125.30	Y
Butyric	110.65	1148.90	Y
Isovaleric	1150.68	1193.87	Y
Valeric	1195.60	1243.21	Y
Caproic	1291.05	1339.05	Y
Enanthic	1388.05	1436.65	Y
Benzoic	1485.87	1575.30	Y
Lactic	1490.24	1532.68	Y
Glycolic	1506.42	1536.70	Y
Phenyl acetic	1524.51	1622.57	Y
α -OH-isovaleric	1605.07	1637.62	Y
Succinic	1759.10	1851.62	Y

이 동정되었고, 미생물 배양액에서는 15개의 유기산이 동정되었다. 동정된 대부분의 peak들이 area ratio에 의해서 재확인 되었으나 분리되지 않거나 off scale된 peak들은 area ratio에 의한 확인이 어려웠기 때문에 온도조건을 바꾸거나 시료를 희석해야할 필요가 있었다.

결 론

Dual-capillary column GC를 이용하여 시료를 한번 주입하여 두 column에서의 동시분석을 함으로써 분석시간을 줄일 수 있었고, 또한 injection error를 줄일 수 있었다. Splitless injection에도 불구하고 RI 값의 재현성이 높았으며 RI library searching에 의한 일차적 확인과 area ratio의 비교에 따른 재확인으로 유기산의 동정이 가능함을 알 수 있다.

고가의 GC-MS 분석에 의뢰치 않고서도 각종 수용액 시료 중의 유기산을 신속히 분석하는데 본 방법이 성공적으로 응용될 수 있다고 본다.

이 논문은 1988년도 문교부지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

인 용 문 헌

1. D. L. Schooley, F. M. Kubiak, and J. V. Evans, *J. Chromatogr. Sci.*, **23**, 385 (1985).
2. D. J. Harvey, J. M. Tiffany, J. M. Duerden, K. S. Pandher, and L. S. Mengher, *J. Chromatogr.*, **414**, 253 (1987).
3. P. Dietel, C. Holzel, K. Schneider, and G. Spittler, *J. Chromatogr.*, **422**, 1 (1987).
4. R. W. Frei and U. A. Th. Brinkman, *Trends in Anal. Chem.*, **1**, 45 (1981).
5. C. Cosmi, A. Dicorcia, R. Samperi, and G. Vinci, *Clin. Chem.*, **29**, 319 (1983).
6. L. H. McMurray, W. J. Blanchflower, D. A. Rice, and M. McLoughlin, *J. Chromatogr.*, **378**, 201 (1987).
7. 김경례, 최동미, 대한화학회지, **31**, 244 (1987).
8. 김경례, 한미경, 대한약학회지 **32**, 6 (1988).
9. D. R. Knapp, "Handbook of Analytical Derivatization Reactions", Wiley, New York, U.S.A., 1979.
10. J. Dorzd, "Chemical Derivatization in Gas Chromatography", Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1981.
11. T. P. Mawhinney and M. A. Madson, *J. Org. Chem.*, **47**, 3336 (1982).
12. K. Kim, A. Zlatkis, E. C. Horning, and B. S. Middleditch, *J. HRC&CC*, **28**, 522 (1987).
13. K. R. Kim, M. K. Hahn, A. Zlatkis, E. C. Horning and B. S. Middleditch, *J. Chromatogr.*, **468**, 289 (1989)
14. K. R. Kim, M. K. Hahn, J. H. Kim and H. K. Park, Proceedings of the Third Korea-Japan Joint Symposium on Analytical Chemistry, 119, (1989).
15. K. R. Kim, J. H. Kim, H. K. Park, and C. H. Oh, *Bulletin of the Korean Chem. Soc.*, 투고중.
16. C. F. Pool and S. A. Schuette, "Contemporary Practice of Chromatography", 2nd Ed., p.151-156, Elsevier, Netherlands, 1985.
17. K. Grob and B. Schilling, *J. Chromatogr.*, **260**, 265 (1983).
18. L. V. Holdeman, E. P. Cato and W. E. C. Moore, "Anaerobe Laboratory Manual", 47th Ed., Virginia Polytech. Inst. and State Univ., Blackburg, Virginia, U.S.A., 1977.