

GLC를 이용한 식품 및 생체 시료 중 아미노산 이성질체의 분리

이재성[†] · 어연우 · 박현미 · 김택제*

한국과학기술연구원 특성분석센터

* 경기대학교 화학과

(1994. 1. 21. 접수)

A Study on the Separation of Racemic Amino acids in Food or Biological Sample with GLC

Jae-Seong Rhee[†], Yun-Woo Eo, Hyun-Mee Park, *Taek-Jae Kim

Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology

* Department of Chemistry, Kyung Ki University

(Received Jan. 21, 1994)

요약 : 아미노산의 광학 이성질체를 분리하는 방법을 확립하고 식품이나 생체에 있는 광학이성질체를 분리 정량하여 영양학이나 생화학적인 관계를 연구한다. 필수아미노산 20종을 포함하여 총 38종의 d, l-form 아미노산을 검색 대상으로 삼았다. 단백질은 한국산 콩, 된장, 고추장, 간장, 분유 및 환자의 백내장을 시료로 하여 산 가수분해 후 esterification과 acylation으로 TFA-IPA 유도체를 만들어 chirasil val GLC column을 사용하여 분리하였다. 이성질화가 일어나는 아미노산은 alanine, aspartic acid, glutamic acid, phenyl alanine으로 식물성 시료인 된장에서는 d-alanine이 검출되었으나 동물성 시료인 백내장과 분유에서는 검출되지 않았다. 연령추정 등 생리적으로 이용이 가장 적절한 것은 분리능과 함량을 비교했을 때 aspartic acid였다. d-form 아미노산의 분율은 가정용 된장이 3~6%, 시판용 된장이 약 3%, 간장이 2~4%, 콩이 약 1%, 백내장 시료에서 1~2%, 분유에서 1.0~1.5%로 검출되었으며, 숙성 발효시 광학이성질체의 변환이 현저함을 알 수 있다.

Abstract : After establishment of methodology for the separation and quantitation of optical isomer existed in food or biomaterial, the relationship between isomer and nutrient or biological sample was investigated. The optical isomers of standard amino acids and free amino acids were quantitized and the protein was assayed from the Korean bean, pasted bean, soy sauce, gochujang, powdered milk and cataract followed by hydrolysis and derivatization with TFA-IPA for GLC analysis with chirasil val column. Amino acids showing the racemization were alanine, aspartic acid, glutamic acid and phenyl alanine. The most convenient amino acid deducing age and biological activity was aspartic acid. Glutamic acid and phenyl alanine have shown poor resolution with less racemization. The ratio of d-form amino acids was 3~6% for home made pasted bean, about 3% for commerical pasted bean, 2~4% for soy sauce, about 1% for bean, 1~2% for cataract, 1.0~1.5% for powdered milk. The racemization during fermentation process was significant.

Key words : Amino acids, optical isomer, TFA-IPA, GLC, chirasil val column

1. 서 론

광학이성질체의 분리는 정확히 정립되지 않은 방법으로 생리적으로나 약리적으로 대단한 중요성이 있다. 생체내에서 합성되는 것은 *l*-form 아미노산이지만 시간이 지남에 따라 racemization이 되어 *d*-form이 함께 섞여 있게 된다. 이러한 연구가 진행됨으로써 생물체의 나이를 추정할 수도 있으며 생체내 현상을 예측할 수도 있다. 약리 현상도 정확한 연구를 위해 이성질체의 분리기술이 요청된다. 본 연구에서는 아미노산의 이성질체를 분리하는 방법을 확립하고 식품이나 생화학적인 관계를 연구하는 데 기여한다.

크로마토그래피를 이용한 enantiomer 분리의 장점은 resolving agent나 이성질체의 순도 등 조건이 까다롭지 않고 시료의 손실이 적으며 일반 시료에 적용할 때처럼 열역학적이나 이론적인 지표들을 얻어낼 수 있다는 점이다.¹ GC는 오래 전부터 광학이성질체를 분리하는데 이용되어 왔고^{2,3}, 주로 유도체를 만들어 시료의 휘발성을 높인 다음에 사용하였다. 유도체화반응에서는 아민기와 알코올, 초산기 등 작용기인 polar group을 masking하는데, 주로 acylation과 esterification을 하게 된다. GC에서 acylation반응에는 2-chloroisovaleryl chloride^{4~7}, (s)-2-methoxy-2-trifluoro methyl phenyl acetyl chloride^{8,9}, (-)-methyl chloro-formate¹⁰ 등의 시약이 사용되었으며, esterification 반응에는 2-phenyl propionyl chloride¹¹, 2-phenyl butyryl chloride¹², o-acetyl lactic chloride¹³ 등이 이용되어 왔다.

본 연구에서는 acylation에 TFA, PFP, HFB를 사용하였고 esterification에는 isopropyl alcohol로 유도체를 만들어 FID와 NPD로 검출할 수 있었다. 한편, polydimethylsiloxane에 안정한 amide linkage로 공유 결합된 구조를 가진 chirasil-val column을 고정상으로 하여 광학이성질체를 분리할 수 있었다.

2. 실험

2. 1. 표준물질 및 시약

표준아미노산은 Sigma제로 5mg을 0.2N-HCl에 녹여 100mL로 채워 사용하고, 내부표준물질인 *l*-norleucine은 12.6mg을 0.2N-HCl에 녹여 100mL로 채운 후 사용하였다.

Trifluoroacetic anhydride(TFA), Pentafluoropropionic anhydride(PFP), Heptafluoro butylic anhydride(HFB)는 Alltech제이며, isopropyl alcohol은 Burdick & Jackson, Dowex 50W-X12 resin H⁺ form(20~400mesh)은 REGIS Chem. Co., Acetyl chloride는 Aldrich제, HCl 및 NH₄OH 용액은 Baker제, ethyl chloroformate는 Fluka제를 사용하였다.

2. 2. 분석기기 및 장치

GLC는 Varian Vista 6000(U.S.A)이고, 검출기는 flame ionization detector(FID)와 thermoionic specific detector(TSD 또는 NPD)이며 GC column은 20m×0.53mm chirasil-val(Alltech associates, INC.)를 사용하였다. clean up column은 30cm×10mm pyrex column(Arthur H. Thomas Co., USA) 사용하였다.

2. 3. 실험방법

2. 3. 1. GLC 조건

GLC 검출기는 FID와 TSD^o며 chirasil val capillary column을 사용하였고, carrier gas(He)은 분당 3ml, make up gas(He)는 분당 30ml, fuel gas로 FID에서는 수소 30ml/min, 공기 300ml/min., TSD에서는 수소 4.5ml/min., 공기 175ml/min로 조절하여 사용하였다. oven 온도는 70℃에서 4분 유지하고 210℃까지 분당 3℃씩 승온하여 25분간 유지시켰다.

2. 3. 2. 표준아미노산 및 시료의 유도체화 반응

표준아미노산 5mL(0.25mg)와 내부표준물질 2mL(0.252mg)를 취해 혼합 후 rotary evaporator에서 수분을 제거하고 acetyl chloride/isopropyl alcohol(2:8, v/v) 혼합액 0.5mL를 가한 다음 ultrasonic cleaner에서 용해시킨 후 teflon cap^o 있는 test tube에 옮긴다. 이것을 110℃ oven에서 1시간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 질소 가스로 과잉의 시약을 날려 보낸다. 여기에 0.3mL methylene chloride와 perfluorocarboxylic

anhydride(TFA, PFP, HFB) 0.2ml를 가하여 뚜껑을 막은 다음 110°C oven에서 30분 반응 후 냉각시킨다. 이것을 다시 질소가스로 과잉의 시약을 날려 보낸 후 histidine을 반응시키기 위하여 0.2ml benzene과 0.1m l ethyl chloroformate을 가하고 110°C oven에서 30분 반응시킨다. 실온으로 냉각시켜 질소가스로 과잉의 시약을 날려 보낸 후 ethyl acetate 0.2ml로 녹여 GC에 0.5μl 주입시킨다.

시료는 시중에 판매되고 있는 된장, 고추장, 분유, 메주콩과 가정에서 재래식으로 제조한 된장, 고추장, 간장을 선택하였고 백내장 환자의 눈에서 떼어낸 단백질을 시료로 삼아 아미노산의 광학이성질체를 분리하였다. 된장, 고추장, 흰콩은 전조하여 미세하게 마쇄하여 처리했으며, 그외의 것은 수분이 있는 상태에서 처리하였다. 시료는 protein으로 25mg 정도 달아서 마개가 있는 15ml test tube에 넣고 6N-HCl 10ml를 넣은 다음 질소가스로 공기를 날려보내고 질소가스를 충진한 다음 마개를 막아서 110°C oven에서 24시간 분해시켰다. 이것을 실온으로 냉각 후 여과하여 50ml 메스플라스크에 채우고 그 중 10ml를 취하여 내부표준물질 2ml를 첨가한 후 DOWEX 50W-X12 충진관에 넣고 용리시킨다. 다시 재증류수 5ml씩 2번 용리시켜 불순물을 제거하고 7N-NH₄OH 10ml와 재증류수 10ml를 차례로 용리시켜 감압 농축하여 표준아미노산 유도체와 같은 과정으로 처리하였다.

유리아미노산은 곱게 마쇄한 시료를 정확히 평량하여 삼각플라스크에 넣고 증류수 30ml를 가한 후 100°C 물증탕에서 30분간 추출시킨 다음 이 추출액을 경사법으로 모으고 잔사에 증류수 30ml로 재추출하고 냉각하여 증류수 100ml로 세척하고 여과하여 합한 것을 추출액으로 하였다. 이 용액은 trifluoroacetic acid 5ml를 가한 후 원심분리하여 침전물을 제거하고 내부표준물질을 넣어 감압 농축 후 resin에 통과시켰다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 유도체별 분리능 검토

d, l-form 아미노산의 유도체별 분리능을 보기 위해 isopropyl ester에 TFA, PFP, HFB로 acylation시켜 분리능을 조사하였다(Table. 1). TFA-IPA 유도체에서는 proline과 hydroxyproline은 D, l-form^o 완전히

겹쳐 한 개의 peak로 나타났으며, d-threonine과 d-valine, l-isoleucine과 d-serine, d-leucine과 d-serine도 서로 다른 아미노산끼리 겹쳤다. d-form과 l-form의 resolution number는 alanine이 3.56으로 가장 크며 histidine이 0.66으로 가장 작은 값을 나타내었고 용리 시간은 50.3분이었다. PFP-IPA 유도체에서도 d-leucine과 l-serine, d-proline과 l-proline, d-hydroxyproline과 l-hydroxyproline이 겹쳤으며 TFA-IPA보다 조금 빨랐다. HFB-IPA 유도체는 분리능이 제일 좋지 못하였는데, 용리 시간은 48.1분으로 PFP-IPA와 비슷하였다. 3가지 유도체 중 TFA-IPA 유도체가 가장 좋은 분리능을 나타냈으며, 시료 중 아미노산 분석의 유도체는 TFA-IPA로 통일하였다.

3. 2. FID와 NPD(TSD)에 의한 감도

FID의 감도를 TSD의 감도와 비교하였을 때 histidine(29.1배), Trans-H-proline(21.7배), Glycine(15.8배), Ornithine(7.5배) 등 감도가 많이 증가하는 것이 있는 반면 threonine(1.94배), valine(2.8배), Tyrosine(1.5배)과 같이 감도의 증가가 작은 것도 있어 화학구조와 구성원소에 따라 서로 다르게 감도에 영향을 미침을 알 수 있었다. TSD는 tailing과 다양한 감도차이로 말미암아 FID처럼 유용하지 않았다. 즉 radical의 안정도에 기여하는 ring이나 전자를 주는 group이 있으면 감도가 증가하는 반면 전자를 끄는 산소나 hydrocarbon chain이 있을 때는 감도가 급격히 감소한다.

3. 3. d, l-표준 아미노산 유도체의 분리

TFA-IPA를 사용하여 유도체화한 후 38종의 표준 아미노산을 GC로 분리하면 겹치는 것 12개를 제외한 26개의 아미노산은 좋은 분리능을 보여 주고 있고 겹치는 것으로는 d-threonine과 d-valine, l-isoleucine과 d-serine, d-leucine과 l-isoleucine, d-proline과 l-proline, d, l-hydroxy proline, l-glutamic acid와 l-phenyl alanine 등은 잘 분리가 되지 않았다.

전체 38종 아미노산의 겹치는 것과 분리능이 만족스럽지 못한 것이 있으므로 두 군으로 나누어 표준 아미노산의 chromatogram을 얻었다(Fig. 1, 2). A군은 29종으로 d, l-alanine, d, l-valine, glycine, d, l-cystein, d, l-aspartic acid, d, l-hydroxy proline(cis), d, l-

Table 1. Retention Time(RT) and Resolution Number(RN) N(O)-perfluoroacyl Amino acid isopropyl ester

Amino Acid	Enantiom	TFA-IPA			PFP-IPA			HFB-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
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
Omithine	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

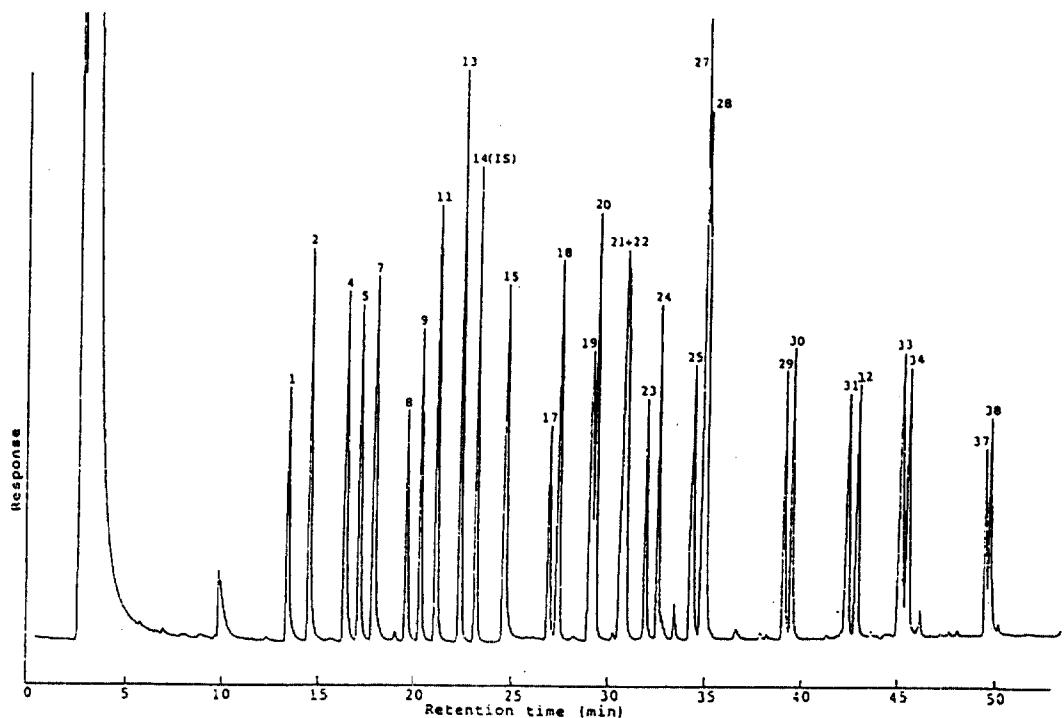


Figure 1. Chromatogram of standard A group of Amino Acids.

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.

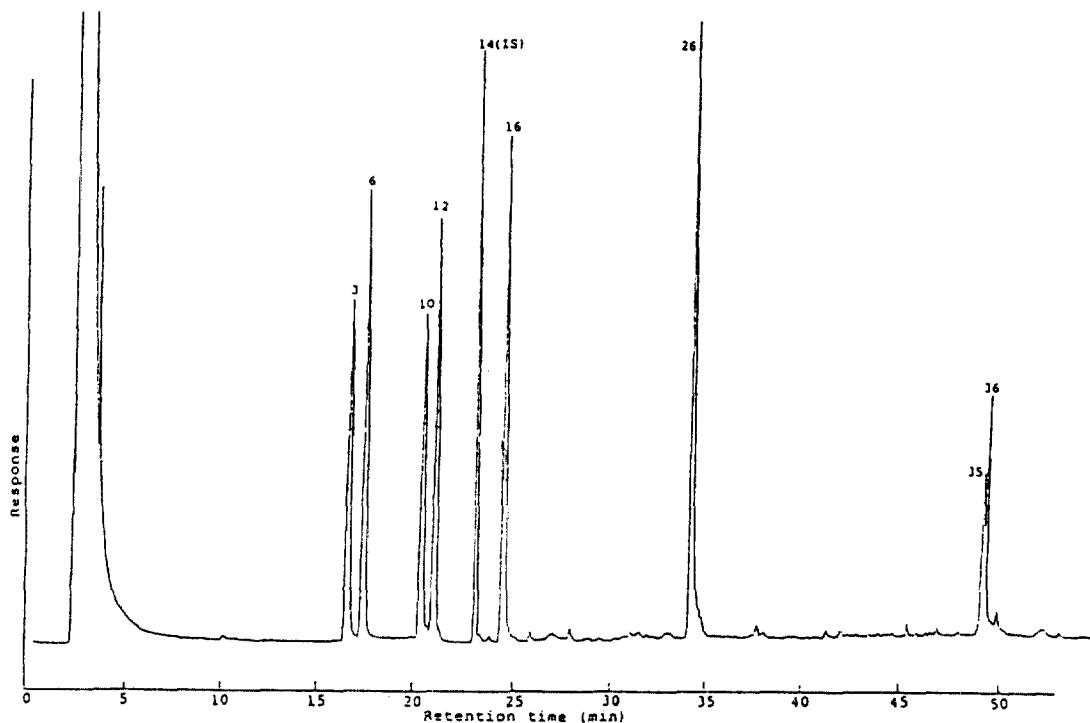


Figure 2. Chromatogram of standard B group of Amino Acids.

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,

methionine, d, l-glutamic acid, l-phenyl alanine, d, l-tyrosine, d, l-ornithine, d, l-lysine, d, l-tryptophan^o]며 B군은 8종으로 d, l-threonine, d, l-serine, l-norleucine, l-proline, d-phenyl alanine, d, l-histidine^o]이다.

3. 4. 여러 시료 중에서 d, l-아미노산의 정량

Fig. 3, 4, Table 2은 한국산 된장 중에서의 free 아미노산과 단백질 중에서의 이성질체 아미노산을 측정한 것이다. 단백질 중에는 d-alanine, d-glutamic acid, d-aspartic acid, d-phenyl alanine만이 d-form이 존재하였고 마찬가지로 free 아미노산에서도 4종류의 아미노산만 d-form이 존재하였다. 총 무게 함량에 따라서 d-form의 비율은 판매용 된장은 3% 정도가 되는 반면 가정에서 숙성시킨 된장 중에서는 3~6%였고 콩에서는 다만 1% 가량 존재한다는 것을 알았다. 현재까지의 결과로는 적은 양이 생체내에서 이성질화를 하지만 미

생물에 의해 숙성될 때 많은 양의 d-aspartic acid가 형성됨이 추측된다. Glutamic acid와 phenyl alanine은 서로 분리능이 만족스럽지 못하기 때문에 각자의 비율을 알아내기 어려웠고 이성질체의 비율이 aspartic acid의 약 3분의 1 정도 되었다. 간장도 된장을 주 원료로 해서 만들어지기 때문에 된장에 포함되어 있는 d-form의 아미노산이 존재하며 aspartic acid의 경우 된장의 약 반 정도 비율을 차지하고 있다.

고추장의 경우는 d-alanine이 보이지 않는게 특이하며 aspartic acid의 경우는 된장의 약 절반 정도의 이성질체 비율인 8.9%와 6.9%를 나타냈다. 간장과 고추장에서의 d-form의 총 비율은 약 3% 정도이다(Table 3).

Table 4에서와 같이 배내장 시료는 생화학적인 면이나 신체해부학적인 면에서 유용할 수 있다. d-glutamic acid나 d-phenyl alanine의 미량 존재가 측정되긴 하지만 실험의 오차 등으로 해서 정량에 문제가 있

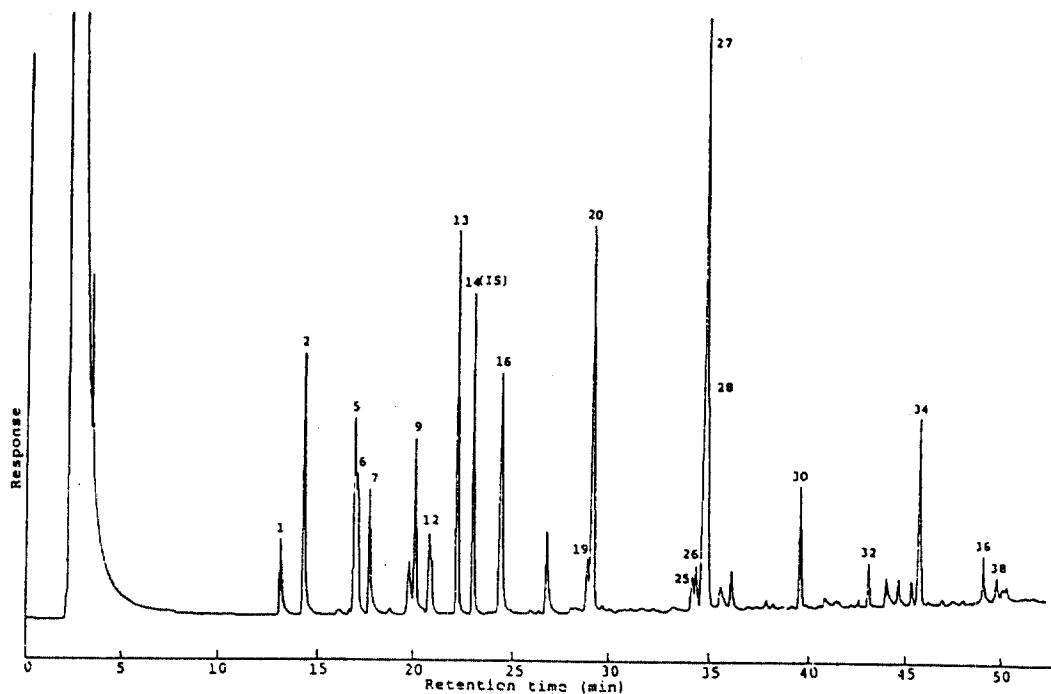


Figure 3. Chromatogram of free d, l-Amino Acids from Soypaste.

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.

으며 d-aspartic acid는 다량 검출되므로 정량에 응용이 충분하다. d-alanine은 식물체내에서와 달리 유제품이나 백내장 등 동물성 시료에서는 검출할 수 없었다.

식품 중의 d-form은 보통 영양가에는 계산이 되지만 실제 사용할 수 없는 부분이기 때문에 정확한 영양가를 알기 위해서는 광학이성질체의 분석도 아울러 수행되어야 한다. 특히 분유는 저온살균과 고온살균의 정도에 따라서 단백질에 대한 변성 유무에 많은 중요성이 존재하고 있다. Aspartic acid의 경우 d-form의 비율은 고온살균 우유인 I, II, III이 5.0%, 4.8%, 5.3%를 나타내고 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%의 비율을 나타내었다. 따라서 고온살균에 의한 이성질체의 변환은 별로 크게 작용되지 않음이 밝혀졌다 (Table 5).

4. 결 론

GC의 chiral column을 사용하여 아미노산의 광학이성질체를 분리하였으며 유도체로서 TFA, PFP, HFB를 사용하여 acylation을 하였을 때 TFA가 제일 좋은 분리능과 안정도를 유지하였다.

Racemization이 일어나는 아미노산은 alanine, aspartic acid, glutamic acid, phenylalanine이었으며 된장 등 식물성 시료는 d-alanine을 검출할 수 있었으나 분유, 백내장 등 동물성 시료에서는 검출되지 않았다. d-form의 비율은 된장이 3~6%, 간장이 2~4%, 콩이 약 1%, 백내장이 1~2%, 또 분유 중에서 1.0~1.5%로 검출되었으며, 숙성 발효시 광학이성질체의 변환이 현저함을 알 수 있었다.

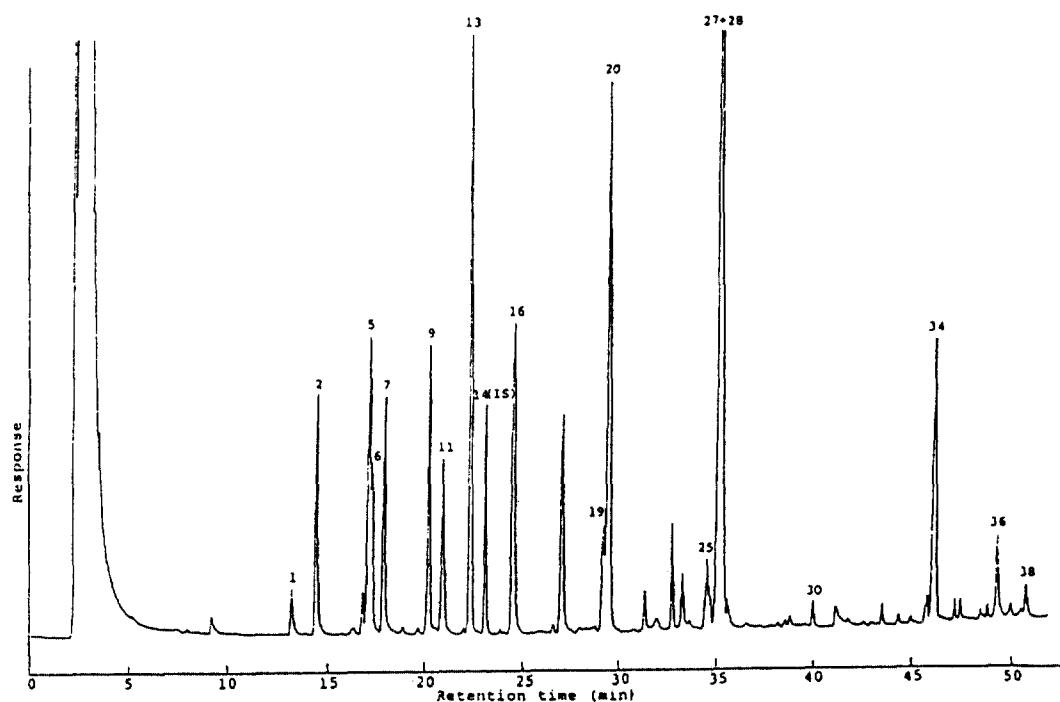


Figure 4. Chromatogram of d, l-Amino Acids from Soypaste.

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 2. 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
100 DA / 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.

Table 3. Contents of Amino Acids 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
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

Table 4. 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
Leucine	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	2.12	1.62	1.86	1.75	1.92	1.74	1.68
Proline	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.09	0.73	0.92	0.92	0.99	0.95	0.82
Cysteine	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.19	0.24	0.16	0.19	0.20	0.14	0.23
Aspartic Acid	d	0.22	0.17	0.16	0.19	0.22	0.16	0.19
	l	1.23	0.71	1.00	0.98	1.11	1.12	0.83
Glutamic Acid	d	0.13	-	0.09	0.09	0.09	-	0.08
	l	3.38	2.89	3.76	2.75	2.96	4.33	2.41
Tyrosine	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	3.38	2.23	3.05	2.18	1.95	2.64	1.82
Lysine	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	1.32	0.69	1.03	0.99	1.00	1.10	0.73
Histidine	d	-	-	-	-	-	-	-
	l	0.89	0.47	0.63	0.70	0.67	0.70	0.50
Total-form Amino Acid		19.33	13.08	16.80	14.95	15.67	17.86	13.67
d-form Amino Acid		0.35	0.17	0.25	0.28	0.31	0.16	0.27
l-form Amino Acid		18.98	12.91	16.55	14.67	15.16	17.70	13.40
100DA/TA(%)		1.81	1.30	1.49	1.87	1.98	0.90	1.98
								1.73

Table 5. 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
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

5. Reference

1. G. M. Janini : D. E. Martire : *J. Chem. Soc. Faraday II*, **70**, 837(1974).
2. D. Lahadarios : I. M. Moodie : G. S. Shepard, *J. Chromatogr.*, **310**, 223(1984).
3. M. Makita : S. Yamamoto : S. Kiyama, *J. Chromatogr.*, **237**, 279(1982).
4. B. Halpern : J. W. Westley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 361(1965).
5. J. W. Westley : B. Halpern, *Anal. Chem.*, **40**, 2046 (1968).
6. R. W. Souter, *J. Chromatogr.*, **108**, 265(1975).
7. B. L. Karger : R. L. Stern : W. Keane, *Anal. Chem.*, **39**, 228(1967).
8. J. A. Dale : D. L. Dull : H. S. Mosher, *J. Org. Chem.*, **34**, 2543(1969).
9. J. Gal : M. M. Ames, *Anal. Biochem.*, **83**, 266(1977).
10. J. W. Westley : B. Halpern, *J. Org. Chem.*, **33**, 3978(1968).
11. S. Hammarstrom : M. Hamberg, *Anal. Biochem.*, **52**, 169(1973).
12. J. D. Gilbert : C. J. W. Brooks, *Anal. Lett.*, **6**, 639 (1973).
13. E. Gil-Ar. : R. Charles : G. Fisher, *J. Chromatogr.*, **17**, 408(1965).