

HPLC법에 의한 1,2-디아미노-4,5-메틸렌디옥시벤젠을 형광유도체화제로 한 혈청 및 뇨 중의 α -케토산의 분석

옥치완* · 김대기 · 박송자* · 박종세*

원광대학교 약학대학, *한국과학기술원 도핑콘트롤센터

(Received July 23, 1992)

Determination of α -Keto Acids in Serum and Urine Using 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a Fluorescent Derivatizing Agent by High Performance Liquid Chromatography

Chi-Wan Ok*, Dae-Ki Kim, Song-Ja Park* and Jong-Sei Park*

College of Pharmacy, Won Kwang University, Ili 570-749, Korea

*Dopping Control Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

Abstract—A simple and sensitive high performance liquid chromatographic method to quantitate α -keto acids in serum and urine was investigated. α -Keto acids react with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) in the presence of 2-mercapto-ethanol and sodium hydrogen sulfite to form highly fluorescent derivatives, substituted 6,7-methylenedioxyquinoxalinol. The derivatization procedure was performed in water bath at 100°C, and completed within 50 min. By the use of a reversed-phase column and multi-step gradient with two solvents, a mixture containing twelve of these derivatives were efficiently resolved within 35 minutes. The optimal wavelength of the fluorescence detector are λ_{ex} =364 nm and λ_{em} =445 nm. The quantitation of the individual α -Keto acids was reproducible with relative standard deviation of 3.0~7.9% and had a detection limits of 10~60 fmol, except for p-hydroxyphenylpyruvic acid (960 fmol).

Keywords □ HPLC, DMB, fluorescent derivatives, α -keto acids.

α -Keto acids는 아미노산, 탄수화물 및 지방산의 생화학적 대사경로에서 생성되는 대사중간물질로서 생화학 및 임상적 측면에서 특정 효소의 결핍 및 불활성으로 나타나는 maple syrup urine disease, phenylketonuria, tyrosinosis, hypermethioninemia, histidinemia 및 chronic pyruvic acidemia 등의 유전적 대사이상질환¹⁾을 조기진단하는데 생체시료 중의 α -keto acids 농도 변화가 중요한 지표가 된다.

생체시료 중의 α -keto acids의 정량법으로는 TLC 법,^{2,3)} GLC,⁴⁻¹⁰⁾ HPLC법,¹¹⁻²²⁾ GC/MS법^{23,24)} 등을 이용한 연구가 많이 보고되었다. α -keto acids는 그 자

체로 분석할 경우 상온에서 불안정하기 때문에 정량의 오차가 크고, 자외선, 형광 또는 그밖의 검출기를 이용하여 분석할 경우 개개의 물질을 명확하게 확인 정량하기가 어려우므로 적당한 유도체화제를 사용하여 안정하고 검출이 용이한 유도체를 만들 필요성이 있다.

2,4-dinitrophenylhydrazine을 유도체화제로한 분석법^{24,12)}은 종전에 널리 사용된 방법이지만 cis-와 trans-이성체의 분리 정량이 어렵고 조작이 복잡하며, 근래에는 o-phenylenediamine을 유도체화제로한 GLC법^{5-10,26)} 및 HPLC법^{11,14-18)}이 이용되고 있다. 그러나 GLC법으로 분석할 경우 추출 조작이 복잡하여 분석시간이 긴 단점이 있고, HPLC법의 경우 흡

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

광도법¹¹⁾은 검출한도가 낮고, 많은 양의 시료가 필요하고, 생체물질이 정량을 방해하는 단점이 있으며, 형광분석법은 생체시료에 의한 방해가 적으므로 많이 사용되는 방법이지만 양자수득율이 낮은 keto acid 등은 검출하기가 어렵고 전처리의 경우 clean up 조작이 요구되는 단점이 있다.

최근에 Nakamura 등²⁰⁾은 chemiluminescence agent로 1,2-diaminophthalhydrazine을 이용한 분석법을 보고하였고, Okura 등은 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene,²¹⁾ 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene(DMB)²²⁾를 형광유도체화제로 하여 α -keto acid를 극미량까지 정량한 바를 보고하였다.

본 연구는 형광유도체화제로서 DMB를 12종 α -keto acid와 반응시켜 유도체 생성유무를 GC/MSD법에 의한 질량스펙트럼을 비교하여 확인하고, 생성된 유도체 각각에 대한 형광특성과 반응시간, 반응온도, 반응액의 HCl 농도 및 DMB와 α -keto acid의 반응몰비에 따른 형광강도를 측정하여 최적조건을 선택하였다. 역상 컬럼과 다단계 gradient 용리법을 이용한 HPLC법으로 생성된 유도체 혼합용액의 분리정량을 검토하였고 정상인과 당뇨병환자의 혈청 중의 α -keto acids를 본 실험방법에 따라 정량하였다.

실험방법

시약 및 시료— α -keto acid류의 표준품과 DMB·2HCl는 Sigma사에서 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였고 N-methyl-N-trimethylsilylheptafluorobutylamide(MTSHFB)는 Macherey Nagel사에서, 2-mercaptoethanol(2-ME), sodium hydrogen sulfite는 Aldrich사에서 구입하였다. 기타시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

당뇨병환자 혈청시료는 원광대학교 의과대학 부속 병원 내원환자로부터 채취하였다. DMB 용액은 1.0 M 2-ME와 30 mM NaHSO₃를 함유하는 0.5 M-HCl 용액에 DMB·2HCl를 용해시켜 6.0 mM이 되게 조제하여 차광하에 0~5°C에서 보관하고 3일마다 새로 조제하여 사용하였으며, α -keto acids 표준용액은 3차 증류수에 녹여 5 mM 농도로 조제한 후 -20°C에서 보관하였다. 단 β -phenylpyruvic acid(PP), 4-hydroxyphenylpyruvic acid(HPP)는 15% ethanol 수용액으로 조제하였고 KG는 수용액에서 자동분해되므로³²⁾

사용직전에 조제하였다.

기기-HPLC는 LKB사(Broma : Sweden) 제품으로 2150 HPLC Pump, 2152 LC Controller, 2221 Integrater이 부착된 것을 사용하였고, Spectrofluorometer와 검출기는 Kontron사의 SFM 25(Japan)를 quinine sulfate로 보정하여 사용하였다.

GC/MSD Hewlett Packard사(U.S.A.)의 Gas Chromatograph 5890 series II와 MSD 5970 series를 사용하였으며 HPLC급의 순수제제는 ELGA사(England)의 UHP 순수제조장치를 이용하였다.

시료용액조제

혈청시료—혈청 50 μ 에 내부표준용액 50 μ 와 제단백제로 0.8 M-HClO₄ 용액 400 μ 를 넣어 혼합하고 상온에서 10분간 방치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상정액 250 μ 를 취하여 증류수 250 μ 로 희석하여 혈청시료용액으로 사용하였다.

뇨시료—6 M-HCl 10 ml에 24시간 동안 채취한 뇨를 넣고 그 중 일부를 취해 3000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 그 상정액의 일정량을 증류수에 5배 희석하고, 희석액 100 μ 를 취해 내부표준용액 100 μ 와 0.4 M-HClO₄ 용액 400 μ 를 넣고 혼합하여 뇨시료 용액으로 사용하였다.

유도체화 조작

형광유도체화 조작—혈청 및 뇨시료 용액 500 μ 를 4 ml screw-capped vial에 넣고 질소가스로 purging하여 DMB 용액 500 μ 를 넣고 즉시 마개를 밀전하고 100°C 수욕에서 50분간 반응시킨 후 ice water에서 냉각하여 반응을 종료시키고 column에 5 μ 주입하여 HPLC 조건(Table I)에 따라 실험하였다.

GC 유도체화 조작—형광유도체화 조작에 의해 얻어진 반응생성물을 0.1 M-인산완충용액(pH=7.0)과 포화 Na₂SO₄ 수용액으로 pH를 변화시키고 ethyl acetate로 추출하여 감압농축한 후 vacuum desiccator(P₂O₅ 존재)에서 12시간 건조하고 TMS화제(MTSHFB : AcCN=5 : 1)를 넣고 80°C에서 30분간 반응시켜 column에 0.2 μ 주입하고 GC/MSD 조건(Table II)에 따라 실험하였다.

실험결과 및 고찰

DMB 유도체의 형광특성 검토— α -keto acids와 DMB가 반응하여 생성된 각 형광유도체들의 여기극

Table I—HPLC condition

- ① Column: TSK gel ODS 120T (250 mm×4.6 mm I.D.; Tosho, Japan)
 ② Mobile Phase: A solvent-AcCN: 40 mM phosphate (pH 7.0)[1:7]
 B solvent-AcCN:MeOH: 40 mM phosphate buffer (pH 7.0)[4:5:4]
 ③ Flow Rate: 1.0 ml/min. ④ Temperature: Ambient Temp.
 ⑤ Wavelength: λ_{ex} = 364 nm λ_{em} = 445 nm
 ⑥ Gradient program:

Time (min.)	3	5	8	12	18	20	30	32	35
A solvent(%)	100	80	80	70	70	60	60	50	50
B solvent(%)	0	20	20	30	30	40	40	50	50

Table II—Operating condition of GC/MSD

- ① Column: Fused silica capillary column SE30 (17 m×0.2 mm I.D.)
 ② Flow Rate: 2.0 ml/min. Carrier gas: Helium
 ③ Injection Temp.: 280°C
 ④ Temp. program: Initial Temp. 120°C $\xrightarrow{10^\circ/\text{min}}$ Final Temp. 300°C (2 min)
 ⑤ Ion source: 280°C, Ionization Energy: 70 eV

Table III—Reaction procedure, molecular weight, excitation and emission maxima and relative fluorescence intensity from the reactions of α -keto acids with 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene(DMB)

Compound ^{a)}	- R	M.W.	Maximum (nm)		RFI ^{b)}
			λ_{ex}	λ_{em}	
KG	-CH ₂ CH ₂ COOH	262	364	445	100
GA	-H	190	366	452	63
PA	-CH ₃	204	362	444	81
KMB	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	264	367, 385	446	13
KB	-CH ₂ CH ₃	218	365	444	67
HPP	-CH ₂ -C ₆ H ₄ OH	296	344, 413	426	0.8
KV	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	232	366	443	83
KIV	-CH(CH ₃) ₂	232	368, 386	442	54
KIC	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	246	362	443	93
PP	-CH ₂ -C ₆ H ₅	280	333	442	25
KC	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	246	369	443	77
KMV	-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	246	358, 392	443	74

^{a)}KG = α -ketoglutaric acid, GA = glyoxylic acid, PA = pyruvic acid, KMB = α -ketomethylbutyric acid, KB = α -ketobutylic acid, HPP = 4-hydroxyphenylpyruvic acid, KV = α -ketovaleric acid, KIV = α -ketoisovaleric acid, KIC = α -ketoisocaproic acid, PP = β -phenylpyruvic acid, KC = α -ketocaproic acid, KMV = α -keto- β -methylvaleric acid.

^{b)}Relative Fluorescence Intensities (KG = 100)

대파장(λ_{ex}), 형광극대파장(λ_{em}) 및 상대형광강도를 검토한 결과는 Table III에서 보는 바와 같이 KG 유도체의 형광강도가 가장 높고 HPP 유도체의 형광강도가 가장 낮게 나타났다. 이들 중 대표적으로 나타낸 KG 유도체의 스펙트럼은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 λ_{ex} 은 364 nm이고 λ_{em} 은 445 nm이었다.

DMB 유도체의 생성검토—각각의 α -keto acid 표

준용액을 분석방법에 따라 실험하여 GC/MSD로부터 얻은 total ion chromatogram은 Fig. 2과 같고 각 α -keto acid의 피이크에 대한 질량스펙트럼은 Fig. 3, 4와 같다. 각 유도체의 질량스펙트럼을 검토한 결과 모든 스펙트럼에서 261 m/z의 fragment ion을 나타내므로 6,7-methyl-enedioxy-2-quinoxalinol 구조임을 확인하였고 각각의 분자 이온 피이크와 분해된 이온 피이

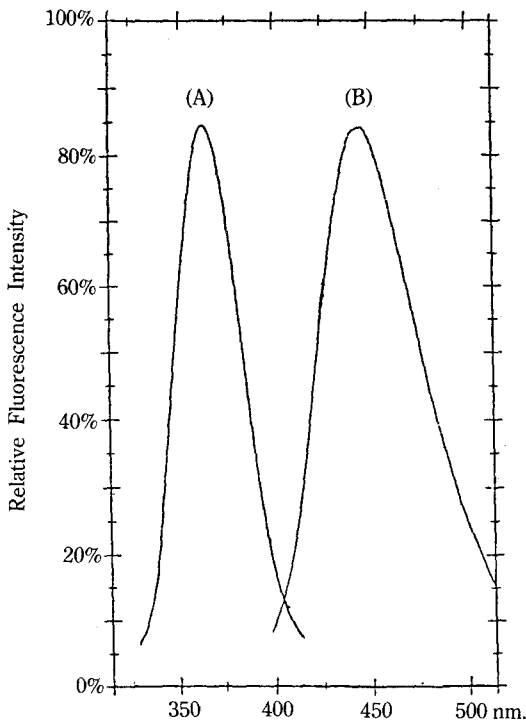


Fig. 1—Excitation and emission spectrum of the reaction product of KG with DMB; (A) excitation spectrum, (B) emission spectrum.

크들을 비교하므로써 DMB와 반응한 각 α -keto acid의 6,7-methylenedioxy-2-quinoxalinol 유도체들

을 확인할 수 있었다.

반응조건에 따른 형광강도변화—KG 표준용액을 100°C 에서 10~80분의 범위에서 10분 간격으로 실험하여 형광을 측정된 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 40분 이상에서 일정한 형광을 나타내었다. 이에 반응시간을 50분으로 채택하여 수욕 중에서 40~100°C 의 범위를 10°C 간격으로 반응시킨 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 90°C 이상에서 일정한 형광을 나타내었다.

반응액의 HCl 농도를 0.05~0.5 mol의 범위에서 0.05 mol 간격으로 실험한 결과 Fig. 7과 같이 0.15~0.35 mol 범위에서 일정한 형광강도를 나타내었다.

DMB 용액과 KG 용액의 물농도 비에 따른 형광강도는 3 이상에서 최대형광을 나타내었다.

α -Keto acids의 분석검토—각 α -keto acid의 유도체를 역상 칼럼(TSK gel ODS 120T)과 기울기 용리법을 이용하여 분리한 결과 Fig. 8, 9, 10에 나타난 바와 같이 12가지 α -keto acid의 피크가 35분 이내에 완전히 용리되었고 혈청 및 뇨시료의 경우 방해없이 각 α -keto acid를 분리할 수 있었다.

반응완료 후 DMB 유도체의 안정성을 검토한 바 마개를 밀전하여 상온(25°C)에서 4시간 이상 방치하거나 또는 마개를 열고 공기 중에 30분 이상 노출하였을 경우 불안정하였다. 변화의 기전은 분명하지 않지만 형광유도체가 산소와 온도에 영향을 받는다는

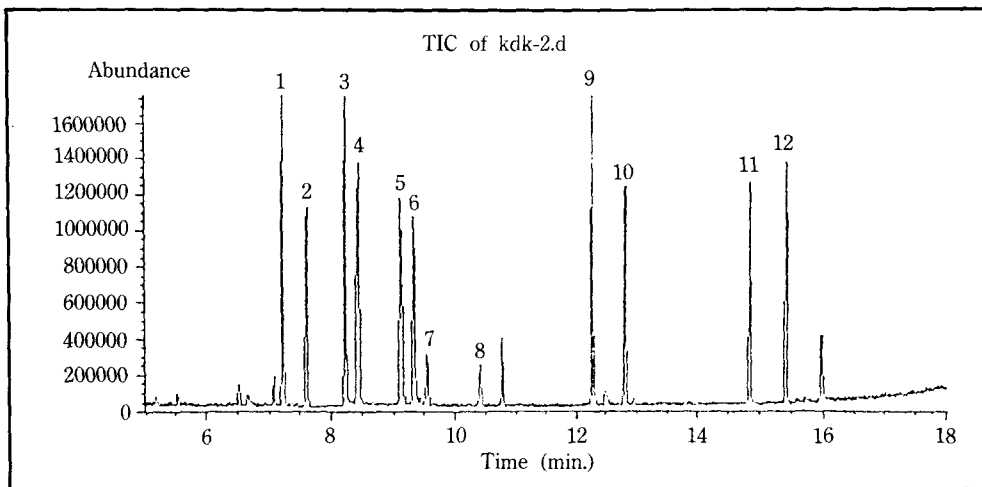


Fig. 2—Total ion chromatogram of 6,7-methylenedioxy-2-quinoxalinol derivatives by Gas chromatography/Mass Selective Detector; (1) GA, (2) PA, (3) KB, (4) KIV, (5) KV, (6) KMV, (7) KIC, (8) KC, (9) KG, (10) PP, (11) KMB, (12) HPP.

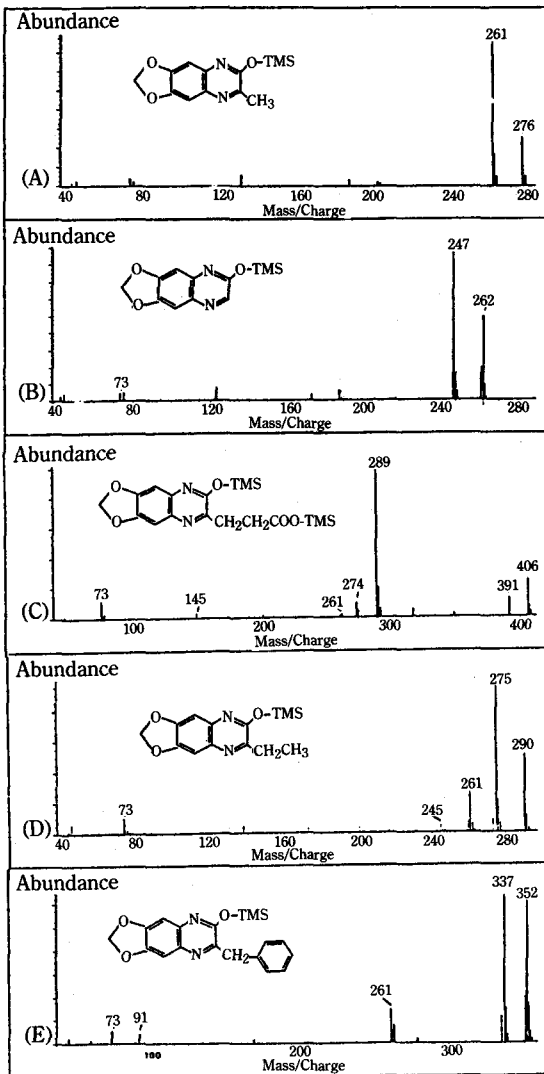


Fig. 3—Mass spectra of the 6,7-methylenedioxy-2-quinoxalinol derivatives of α -keto acids; (A) PA, (B) GA, (C) KG, (D) KB, (E) PP.

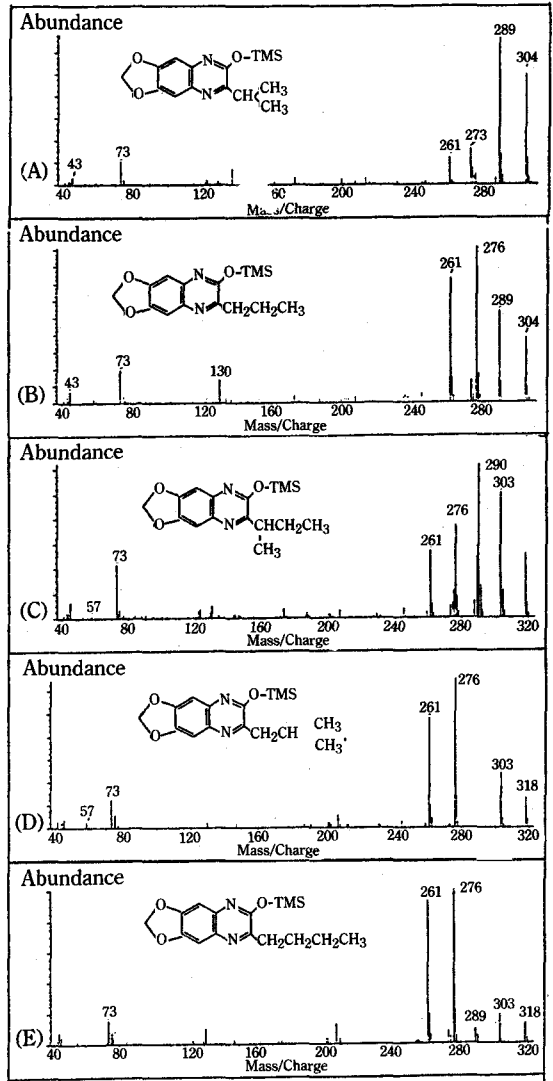


Fig. 4—Mass spectra of the 6,7-methylenedioxy-2-quinoxalinol derivatives of α -keto acids; (A) KIV, (B) KV, (C) KMV, (D) KIC, (E) KC.

보고³⁰⁾가 있다. 마개를 밀전하여 0~4°C 에서 보관하였을 경우 5시간 동안은 안정하였다.

이에 본 실험조작에서는 반응전에 산소를 제거하기 위해서 질소충진하고 유도체화 후 0~4°C 에서 보관하고 5시간 이내에 분석하였다.

회수율 및 직선성 검토—혈청시료에 첨가한 각 α -keto acid의 회수율 시험은 8회 반복 실시한 결과 Table IV에서 보는 바와 같이 상대표준편차는 3.0~7.7% 범위 이내이고 회수율은 91~101%의 양호한 결과를

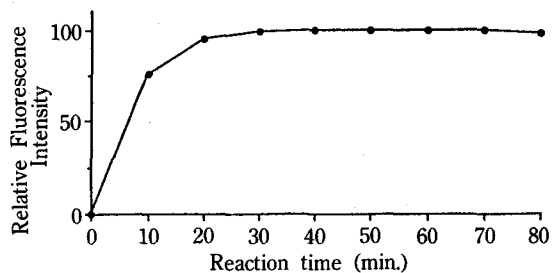


Fig. 5—Effect of the reaction time on the fluorescence reaction of KG with DMB in water bath at 100°C.

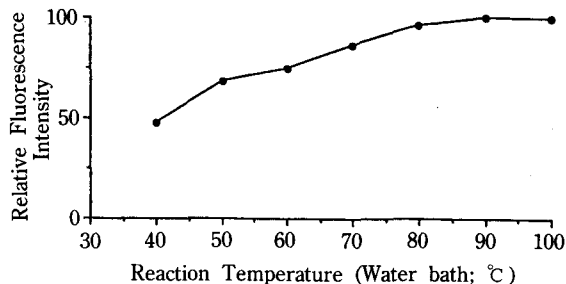


Fig. 6—Effect of the reaction temperature on the fluorescence reaction of KG with DMB for 50 min.

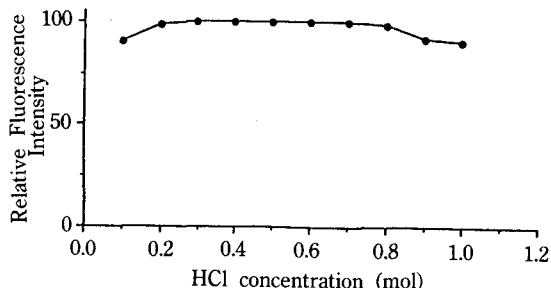


Fig. 7—Effect of concentration of HCl on the fluorescence reaction of KG with DMB.

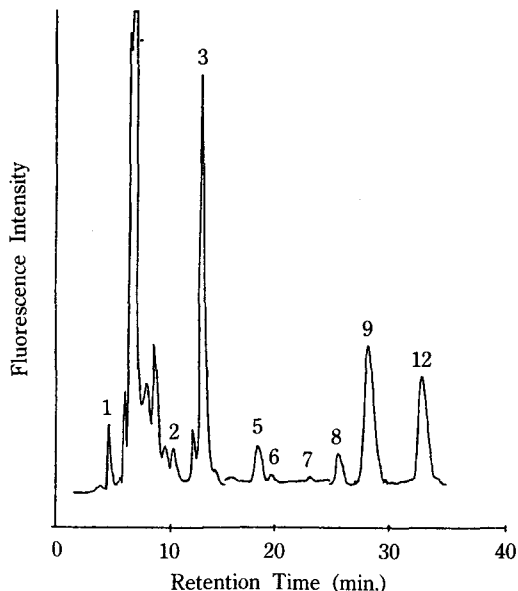


Fig. 9—Chromatogram of the DMB derivatives of α -keto acids obtained from normal serum sample. Peaks are indicated in Fig. 8. The detector sensitivity was increased 8-fold between elution for 15 and 24 min.

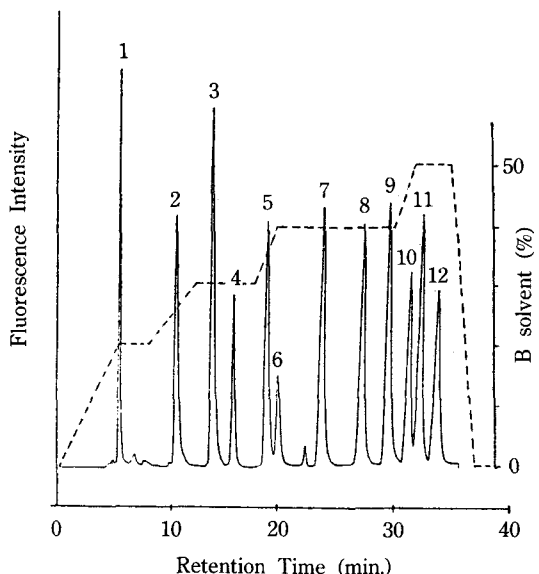


Fig. 8—Chromatogram of the standard mixture derivatives of the α -keto acids Peaks; (1) KG, (2) GA, (3) PA, (4) KMB, (5) KB, (6) HPP, (7) KV, (8) KIV, (9) KIC, (10) PP, (11) KC, (12) KMV.

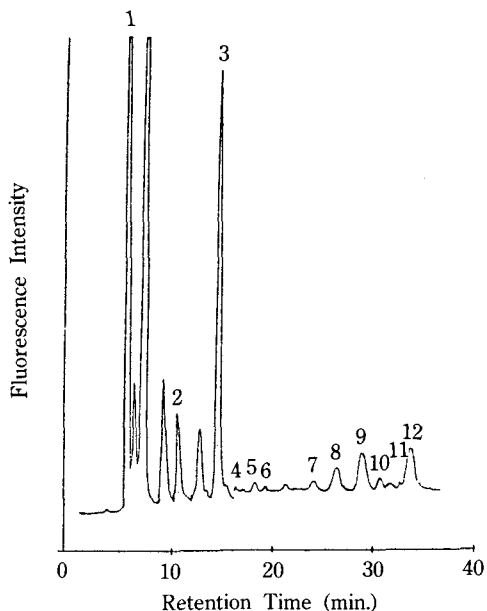


Fig. 10—Chromatogram of the DMB derivatives of α -keto acids obtained from normal urine sample. Peaks are indicated in Fig. 8. The detector sensitivity was increased 16-fold after elution for 15 min.

Table IV—Recovery of α -keto acids from human serum (nmol/ml)

Sample	KG	GA	PA	KMB	KB	HPP	KV	KIV	KIC	KMV
1	15.85	10.89	76.57	27.52	10.24	47.35	11.04	24.55	45.02	31.84
2	16.81	10.01	74.32	29.37	9.70	46.72	10.14	26.24	44.47	32.35
3	17.22	10.22	72.29	29.85	10.91	49.54	9.82	27.12	43.09	30.06
4	13.67	9.67	78.21	27.76	11.52	42.77	9.21	23.65	42.36	28.51
5	15.32	10.13	75.20	25.94	10.68	48.91	10.25	26.37	46.62	30.52
6	16.05	10.04	70.66	30.72	9.98	45.05	9.37	25.83	44.85	32.38
7	14.19	9.74	73.74	28.33	11.68	44.48	8.65	24.07	45.37	29.93
8	15.66	11.14	77.39	27.11	10.45	47.86	9.70	25.39	43.88	31.59
Mean	15.60	10.23	74.80	28.32	11.15	46.58	9.77	25.40	44.46	30.90
\pm S.D.	1.20	0.52	2.57	1.57	0.66	2.32	0.73	1.20	1.34	81.37
RSD(%)	7.7	5.1	3.4	5.5	5.9	5.0	7.4	4.8	3.0	4.4
Blank	5.53	0.21	68.43	—	2.03	0.06	0.02	16.25	34.87	21.64
Added Amount	10.0	10.0	10.0	30.0	10.0	50.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Recovery(%)	101	100	95	94	91	93	98	97	99	98

Table V—Concentration of α -keto acids in serum of healthy and diabetic subjects (nmol/ml)

Compound (α -keto acids)	Healthy Subjects		Diabetic Subjects	
	Mean \pm S.D.		Mean \pm S.D.	
	Male(n=6)	Female(n=4)	Male(n=5)	Female(n=5)
KG	5.54 \pm 1.47	6.87 \pm 1.43	4.78 \pm 1.63	4.88 \pm 0.58
GA	0.36 \pm 0.37	0.45 \pm 0.22	0.39 \pm 0.39	0.33 \pm 0.29
PA	88.6 \pm 19.4	85.2 \pm 20.5	127.7 \pm 53.5	113.6 \pm 42.2
KMB	*	*	<0.01	<0.01
KB	1.83 \pm 0.40	1.29 \pm 0.43	7.42 \pm 2.07	3.38 \pm 1.01
HPP	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
KV	0.05 \pm 0.04	0.03 \pm 0.03	0.10 \pm 0.10	0.04 \pm 0.04
KIV	12.2 \pm 2.60	12.1 \pm 3.70	21.8 \pm 5.94	27.2 \pm 8.51
KIC	34.5 \pm 10.0	35.9 \pm 8.90	46.1 \pm 14.7	48.7 \pm 15.6
KMV	25.9 \pm 4.80	19.8 \pm 8.30	34.2 \pm 13.0	32.2 \pm 11.8

*Not detected

얻었다.

각 α -keto acid의 농도가 0.5~30 nmol/ml 범위에서 각각의 피이크 면적과 내부표준물질의 피이크 면적에 대한 비로서 양호한 직선성을 나타냈으며 각각의 상관계수는 0.993 이상이었다. 각 α -Keto acid의 검출 한계는 S/N=5에서 2~12 pmol/ml 이내이었다. 단, HPP는 190 pmol/ml로 quantum efficiency가 낮다.

정상인과 당뇨병환자의 혈청 중의 α -Keto acids 정량—본 방법에 따라 정상인 남자 6명(20~30세) 및 여자 4명(20~27세)의 혈청과 당뇨병환자 남자 5명(40~60세) 및 여자 5명(40~56세)의 혈청 중의 α -keto acids를 정량한 결과는 Table V와 같다. 당뇨병환자²⁷⁻²⁹⁾와 정상인의 혈청 중의 α -keto acids를

비교한 바 Leu, Val, Ile과 밀접한 관계가 있는 KIC, KIV, KMV 등과 PA 및 KB의量は 높게 나타났다.

결 론

DMB를 α -keto acid와 반응시켜 생성된 6,7-methylenedioxy-2-quinoxalinalol 유도체의 반응성을 검토한 바 HCl 농도가 0.25 mol이고, 100°C 수욕에서 50분간 반응시켰을 때 형광강도가 가장 양호함을 알 수 있었다.

12종의 α -keto acid 유도체들을 역상 컬럼과 Gradient 용리법으로 완전히 분리하였으며 각 α -keto

acid의 검출한계는 10~60 fmol(HPP 제외)로 극미량까지 정량할 수 있었다.

이상의 결과로 DMB를 형광유도체화제로 하여 α -keto acids를 선택적으로 반응시켜 HPLC법으로 간편하게 극미량까지 정량하므로써 대사이상의 진단 및 치료에 효과적으로 응용될 수 있다고 사료된다.

문 헌

- 1) Delvin, T.M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley Medical Publication, pp. 453-488 (1986).
- 2) Ronkainen, P.: Chromatographic identification of carbonyl compounds VI. Thin-layer chromatographic resolution of mixtures of keto acid 2,4-dinitrophenylhydrazones. *J. Chromatogr.*, **28**, 263-269 (1967).
- 3) Mowbray, J. and Ottaeway, J.H.: The preparation of α oxo acid derivatives suitable for specific-radioactivity determination. *Biochem. J.*, **120**, 171-175 (1970).
- 4) Kallio, H. and Linko, R.R.: Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenylhydrazones of keto acid methyl esters. *J. Chromatogr.*, **76**, 229-232 (1973).
- 5) Cree, T.C., Hutson, S.M. and Harper, A.E.: Gas-liquid chromatography of α -keto acids. Quantification of the branched-chain α -keto acids from physiological sources. *Anal. Biochem.*, **92**, 156-163 (1979).
- 6) Langenbeck, U., Wendel, U., Hoinowski, A.M., Kuschel, D., Becker, K., Przyrembel, H. and Bremer, H.J.: Correlations between branched-chain amino acids and branched-chain α -keto acids in blood in maple syrup urine disease. *Clin. Chim. Acta*, **88**, 283-291 (1978).
- 7) Early, R.J., Thompson, J.R., Mcallister, T., Fenton, T.W. and Christopherson, R.J.: Branched-chain α -keto acid analysis in biological fluids. Preparative clean-up by anion-exchange and analysis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **310**, 1-10 (1984).
- 8) Woolf, L.I. Hasinoff, C. and Perry, A.: Estimation of branched-chain α keto acids in blood by gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **231**, 237-245 (1982).
- 9) Hoffman, N.E. and Killinger, T.A.: Gas chromatographic analysis of pyruvic and α -ketoglutaric acids. *Anal. Chem.*, **41**, 162-163 (1969).
- 10) Langenbeck, U., Hoinowski, A., Mantel, K. and Hohring, H.U.: Quantitative gas chromatography and single-ion detection of aliphatic α -keto acids from urine as their O-trimethylsilylquinoxalinol derivatives. *J. Chromatogr.*, **143**, 39-50 (1977).
- 11) Hayashi, T., Todoriki, H. and Naruse, H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids. *J. Chromatogr.*, **224**, 197-204 (1981).
- 12) Terada, H., Hayashi, T., Kawai, S. and Ohno, T.: High-performance liquid chromatographic determination of pyruvic acid and α -ketoglutaric acid in serum. *J. Chromatogr.*, **130**, 281-286 (1977).
- 13) Nissen, S.L., Huysen, C.V. and Haymond, M.W.: Measurement of branched-chain amino acids and branched chain α -keto acids in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **232**, 170-175 (1982).
- 14) Koike, K. and Koike, M.: Fluorescent analysis of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, **141**, 481-487 (1984).
- 15) Qureshi, G.A.: High performance liquid chromatographic methods with fluorescence detection for the determination of branched-chain amino acids and their alpha-keto analogues in plasma samples of healthy subjects and uraemic patients. *J. Chromatogr.*, **400**, 91-99 (1987).
- 16) Hayashi, T., Tsuchiya, H. and Naruse, H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in plasma with fluorometric detection. *J. Chromatogr.*, **273**, 245-252 (1983).
- 17) Smeaton, T.C., Owens, J.A. and Robinson, J.S.: Micro-method for measurement of branched-chain keto acid concentrations in plasma from sheep and man. *J. Chromatogr.*, **487**, 434-439 (1989).
- 18) Hayashi, T., Tsuchiya, H., Todoriki, H. and Naruse, H.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human urine and plasma. *Anal. Biochem.*, **122**, 173-179 (1982).

- 19) Hayashi, T., Sugiura, T., Terada, H., Kawai, S. and Ohno, T.: High-speed liquid chromatographic determination of phenylpyruvic acid. *J. Chromatogr.*, **118**, 403-408 (1976).
- 20) Nakahara, T., Ishida, J., Yamaguchi, M. and Nakamura, M.: Determination of α -keto acids in serum and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Biochem.*, **190**, 309-313 (1990).
- 21) Hara, S., Takemori, Y., Yamaguchi, M., Ohkura, Y. and Nakamura, M.: High performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human serum and urine using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.*, **344**, 33-39 (1985).
- 22) Wang, Z.J., Zaitso, K. and Ohkura, Y.: High-performance liquid chromatographic determination of α -keto acids in human serum and urine using 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene as a precolumn fluorescence derivatization reagent. *J. Chromatogr.*, **430**, 223-231 (1988).
- 23) Rocchiccioli, F., Leroux, J.P. and Cartier, P.: Quantitative gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry of 2-ketoglutarate from urine as its O-trimethylsilylquinoxalinol derivative. *J. Chromatogr.*, **226**, 325-332 (1981).
- 24) Hachey, D.L., Patterson, B.W., Elsas, R.J. and Reeds, P.J.: Isotopic determination of organic keto acid pentafluorobenzyl esters in biological fluids by negative chemical ionization gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **63**, 919-923 (1991).
- 25) Jakobs, C., Solem, E., Ek, J., Khalvorsen, K. and Jellum, E.: Investigation of the metabolic pattern in maple syrup urine disease by means of glass capillary gas chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.*, **143**, 31-38 (1977).
- 26) Favier, A. and Caillat, D.: Determination of urinary α -keto- λ -methylthiobutyric acid in hypermethionemia by use of gas chromatography and flame photometry. *Clin. Chim. Acta*, **79**, 419-423 (1977).
- 27) Liebich, H.M., Pickert, A. and Woll, J.: Analysis of the oxocarboxylic acid fraction in serum and urine as O-methylloximes by thermionic specific detection. *J. Chromatogr.*, **217**, 255-262 (1981).
- 28) Schauder, P., Schroder, K., Matthaei, D., Henning, H.V. and Langenbeck, U.: Influence of insulin on blood levels of branched chain keto and amino acids in man. *Metabolism*, **32**, 323-326 (1983).
- 29) Liao, J.C., Hoffman, N.E., Barboriak, J.J. and Roth, D.A.: High-performance liquid chromatography of pyruvic and α -ketoglutaric acids and its application to urine samples. *Clin. Chem.*, **25**, 802-805 (1977).
- 30) Livesey, G. and Edwards, W.T.E.: Quantification of branched-chain α -keto acids as quinoxalinols: importance of excluding oxygen during derivatization. *J. Chromatogr.*, **337**, 98-102 (1985).
- 31) Penttila, I., Huhtikangas, A., Herranen, J. and Moilanen, O.: Gas chromatographic determination of serum branched-chain α -keto acids derivatized by extractive alkylation. *J. Chromatogr.*, **338**, 265-272 (1985).
- 32) Kieber, D.J. and Mopper, K.: Trace determination of α -keto acids in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **183**, 129-140 (1986).