

잔류농약의 액체 크로마토그래피 분석법 개발에 관한 연구 (I) Thiocarbamates 제초제의 분리 최적화

李大云* · 崔鶴旭 · 徐準夏
연세대학교 이과대학 화학과
(1991. 7. 5 접수)

Studies on the Development of Liquid Chromatographic Methods for Pesticide Residues (I)-Separation Optimization of Thiocarbamates

Dai Woon Lee*, Yong Wook Choi, and Joon Ha Suh
Department of Chemistry, Yonsei University, Seoul 120-794, Korea
(Received July 5, 1991)

요 약. 제초제로 사용되는 11종의 티오카바메이트의 역상 액체 크로마토그래피 분석법을 개발하고자 용리거동과 최적 분리조건을 찾는 방법을 연구하였다. 등용매 용리법으로 심플렉스 통계 기법을 도입하여 최적화를 연구하였다. 분리도의 정량적인 평가는 COF 및 ORM 방법을 이용하였다. 용매조성에 따른 용리순서의 변화가 심한 티오카바메이트 제초제의 경우에는 ORM 방법으로 구한 분리조건이 COF보다 더 좋은 결과를 나타내었다. ORM 방법에서의 용매 조성비는 메탄올 : 아세토니트릴 : 테트라히드로푸란 : 물이 16 : 29 : 2 : 53의 비율이었다. 또한 본 연구에서는 COF 방법의 단점을 보완하기 위하여 보정된 COF 방법(COF)을 제시하였고, 그 때의 이동상의 조성비는 메탄올 : 아세토니트릴 : 물이 29.5 : 21.5 : 49.0이었으며, ORM 방법으로 구한 용매 조성비에서의 크로마토그램과 거의 유사한 분리도를 얻었다.

ABSTRACT. The method for investigating the retention behavior and separation optimization was studied to develop a reversed-phase liquid chromatography of eleven thiocarbamates that are used as herbicides. As an isocratic elution system, the statistical simplex technique was applied to find the optimum separation conditions. The resolution was quantitatively evaluated by using COF and ORM method. For thiocarbamate herbicides in which the elution order varies dramatically with solvent composition, the ORM method gave better result than the COF method. For the solvent composition of mobile phase in the ORM method, the ratio of methanol : acetonitrile : tetrahydrofuran : water was 16 : 29 : 2 : 53. Also in this research, an adjusted COF (COF) method was proposed to rectify the defect in the current COF method, and the compositional ratio of mobile phase containing methanol : acetonitrile : water was 29.5 : 21.5 : 49.0 result of which is similar to that obtained by the ORM method.

서 론

새로운 농약의 개발과 더불어 그 농약에 대한 분석법 확립에 대한 것도 대단히 중요한 과제라 할 수 있다. 일반적으로 농약 및 그 대사물질의 분석은 기체 크로마토그래피(GC)^{1,2}, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)^{3,4} 및 고성능 얇은 층 크로마토그래피(HPTLC)⁵로 분리하고 분석하며, 질량분석법(MS)⁶

으로는 성분 확인과 정량을 하며, 전기화학 분석법^{7,8}이나 형광분석법⁹도 성분확인과 정량에 이용된다. 또한 GC-MS¹⁰나 LC-MS^{11,12}와 같이 두 가지 기기를 서로 연결하여 사용하는 경우도 있다.

한편 열적으로 불안정한 카바메이트류 농약은 HPLC로 분석하는 경우가 많으며^{13,14}, 시료처리, 유도체화 등의 간편성을 고려하여 보면 역상 액체

크로마토그래피(RPLC)에 의한 분리, 분석이 많이 수행되고 있다^{15,16}. 잔류농약 분석에는 일성분 및 다성분 동시 분석이 있는데 대부분 다성분 동시분석법(multiresidue method, MRM)을 사용한다. 다성분 동시 분석을 하기 위한 필수 요건은 GC나 LC 상에서 목적 성분들을 효과적으로 분리할 수 있는 최적 분리조건을 찾는 것이다. Simplex법¹⁷을 도입하면 여러 가지 실험 조건에서 원하는 조건을 체계적으로 찾는데 도움이 된다. 이것을 체계화하기 위해서는 크로마토그램을 종합적으로 정량적인 평가를 할 수 있는 파라미터가 필요하다. 이러한 파라미터에는 window diagram¹⁸, CRF(chromatographic response function)¹⁹⁻²¹, COF(chromatographic optimization function)²², ORM(overlapping resolution maps) 등²²이 있으며, LC에서는 이러한 방법을 도입하여 이동상의 용매강도(solvent strength)와 선택성(selectivity)을 최적화하는데 이용하고 있다.

Laub들은 두 정지상이 결합된 GC를 이용하여 혼합물의 동시 분리를 위한 두 정지상의 최적 부피비를 결정하는데 computer program을 이용하였고²³, Morgan과 Deming은 isomeric octane류에 대한 최적 분리조건을 찾는데 있어서 GC의 여러 분리 파라미터를 결정하는 simplex method에 대한 연구를 하였다¹⁹. HPLC를 사용한 최적화 방법에 대한 연구는 1979년 Watson과 Carr가 크로마토그램의 분리도를 계산하여 용매의 최적 분리조건을 찾는 simplex method를 연구 발표하였다²⁰. Glajch들은 이러한 최적 분리조건을 찾는 방법을 Snyder의 solvent selectivity-triangle concept와 mixture design statistical technique을 결합하여 체계화하는 연구를 하였다²². 이들은 크로마토그램의 분리도를 COF로 하여 통계적인 simplex method로 최적 조건을 찾아내었고, 복잡한 시료계에 대해서는 ORM 방법이 효과적이라고 하였다.

본 연구는 11가지 종류의 thiocarbamate 유도체들의 용리거동을 고찰하고 아울러 이들의 동시분리를 하기 위하여 먼저 최적 분리조건을 COF 방법과 ORM 방법으로 조사하였다. 또한 두 방법의 체계화를 위해 용매 조성도와 분리도와의 관계를 표시해주는 simplex screening design²⁴을 personal com-

puter를 이용하여 간단하게 계산할 수 있도록 시도하였다.

실 험

측정기기 및 기구. 본 연구에서 사용한 기기는 Waters사 M-45 Solvent Delivery System 펌프, LDC사 Spectromonitor III UV 검출기, Rheodyne model 7125 시료 주입기와 Shimadzu사 Chromatopac CR-6A 적분기를 사용하였다. 초음파 진동기로는 Smithkline사 제품인 Branson Ultrasonic Cleaner를 사용하였고, 시료 및 용매 거름 기구는 Millipore사 제품을 사용하였다. 시료의 검출파장은 220 nm, 검출기의 감도는 0.5 AUFS, 이동상의 흐름 속도는 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 기록지 속도는 $0.5 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ 으로 고정하였다.

시 료. 11종의 티오카바메이트 표준물질은 국내 모연구소로부터 기증받은 것을 정제없이 사용하였고, 이들의 구조식, 분자량 및 녹는점을 Table 1에 나타내었다.

시료용액은 모두 순수한 메탄올에 녹여서 제조하였고, 각각의 흡광도를 고려하여 모두 $10^{-4} M$ 정도의 농도로 하였고, 시료 거름기구(sample clarification kit)를 사용하여 고형미립자를 제거한 후 Hamilton사 #702 microsyringe를 사용하여 $5 \mu\text{L}$ 씩 주입하였다.

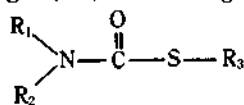
이동상 및 정지상. 이동상으로는 HPLC용 메탄올(Mallinckrodt), 아세트니트릴(BDH) 및 테트라히드로푸란(Burdick and Jackson)을 HPLC용 물과 적당한 부피비로 혼합하여 사용하였다. 모든 이동상은 사용하기 전에 $0.5 \mu\text{m}$ 의 millipore 거름종이를 사용하여 거른 후 초음파 진동기로 약 20분간 진동시켜 이동상에 녹아 있는 기체를 제거시키고 하루 정도 평형을 유지시킨 후 사용하였다.














정지상으로는 LDC사 제품인 Spherisorb ODS 컬럼($25 \text{ cm} \times 3 \text{ mm ID.}$)을 사용하였다.

실험방법. Thiocarbamate의 용량인자, k' 은 시료를 녹인 메탄올의 부피를 t_0 로 하여 $k' = (t_R - t_0) / t_0$ 로부터 계산하였다. t_R 은 시료 성분의 머무른 시간이다.

UV 스펙트럼은 Shimadzu사 UV-240 분광 광도

Table 1. Structural formula, molecular weight (mw) and melting point (mp) of thiocarbamates



Cpd. No	R ₁	R ₂	R ₃	mw	mp (°C)
1	CH ₃	CH ₃	CH ₂  Cl	229.5	39~40
2	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂  Cl	257.5	*
3	(CH ₃) ₃ C		CH ₂  Cl	271.5	84~85
4		H	CH ₂  Cl	257.5	100~102
5	CH ₃ CH ₂ CHCH ₃	H	CH ₂  Cl	257.5	81~83
6			CH ₂ 	237.0	43~44
7	CH ₃ 	H	CH ₂ CH ₃	195.5	80~82
8	CH ₃ CH ₂ 	H	CH ₂ CH ₃	209.0	84~86
9	Cl 	H	CH ₂ CH ₃	215.5	98~101
10	O ₂ N  CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	234.0	128~129
11	 CH ₃ Cl	H	CH ₂ CH ₃	229.5	101~102

Cpd. No. : compound number, *liquid phase in room temperature.

계를 사용하여 500에서 190 nm까지 주사하여 얻었고, 녹는점은 electrothermal 측정 장치로 측정하였다.

최적 분리조건을 찾는 실험은 IBM personal computer를 이용하여 pascal 언어로 program하여 계산하였고, simplex screening design은 Epson LX-80 printer를 사용하여 시도하였다.

결과 및 고찰

구조 및 UV 특성. Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 이 실험에서 사용한 11종의 티오카바메이트류 제조제는 크게 S-phenyl 집단과 N-phenyl 집단으로 대별된다. 티오카바메이트 No. 2는 이미 Saturn(Kumiai)으로 명명되어 사용되고 있다.

액체 크로마토그래피에서 가장 일반적인 검출기는 UV-VIS 검출기로서 티오카바메이트류들 이 검출기로 측정하기 위해 이들의 전자 흡수 스펙트럼을

측정하였다. Table 2에서는 메탄올 용매조건에서 티오카바메이트류들의 최대 흡광파장 및 몰 흡광계수(molar extinction coefficient)를 측정하였고, 파장이 210, 220, 254 및 280 nm에서의 몰 흡광계수를 나타내었다. 이것은 시료의 특성에 맞게 파장을 선택할 수 있고, 또한 파장에 따른 선택성을 나타내게 하는데 많은 정보를 제공한다. S-phenyl 집단은 대부분 220 nm에서 최대흡광도를 나타내었다. 특히 No. 10의 티오카바메이트는 벤젠 고리의 파라위치에 발색단인 니트로기가 치환되어 있어서 녹인 용액은 노란빛을 발하며 최대흡수 파장도 373 nm이고, 세 파장에서 흡수 띠를 나타낸다.

따라서 단일 파장에서 고정시켜 측정할 때 이 실험에서는 220 nm를 선택하였다. 카바메이트 계통의 농약은 대부분 자외선 최대 흡수파장이 190~210 nm에 분포되어 있는데, 이것은 카르보닐 화합물에서 n→π*로 전자가 전이하는 것에 기인된 것이다.

Table 2. UV characteristics of thiocarbamates investigated

Cpd. No.	$\lambda_{\max}(\epsilon_{\max})$	$\lambda_1(\epsilon_1)$	$\lambda_2(\epsilon_2)$	ϵ_{210}	ϵ_{220}	ϵ_{254}	ϵ_{290}
1	220 (13200)			11100	13200	200	200
2	220 (14400)			12200	14400	680	230
3	220 (14700)			12600	14700	170	140
4	220 (13000)			10900	13000	510	230
5	220 (7090)			5000	7100	160	40
6	212 (15500)			15200	12700	170	90
7	251 (17404)	203 (13500)		11000	4300	17300	2400
8	251 (19400)	203 (13200)		11720	4500	19300	2600
9	253 (21800)	203 (12600)		9700	3600	21800	2800
10	373 (20400)	203 (11500)	225 (8500)	9700	7900	4500	1600
11	220 (19400)	242 (11900)		16700	8400	7200	1200

Cpd. No.: compound number.

기존의 티오카바메이트 제초제인 butylate, pebulate 및 vernolate의 최대흡수 파장이 오직 205 nm에만 있는 것은 Sparacino들의 실험을 통해 알 수 있었다.²⁵ 이 실험에서 선택한 티오카바메이트류들은 적어도 한 개 이상의 벤젠고리를 지니고 있어서 벤젠고리의 공액계가 가능한 No. 7~11의 티오카바메이트류들은 장파장 이동을 발생하여 최대 흡수 파장이 250 nm 부근에 분포하는 것으로 생각된다.

용리거동. 역상 액체 크로마토그래피에서 이온성 물질이 아닌 경우에는 이동상 중의 유기조절제의 양이 감소함에 따라 대상물질의 소수성은 일정하게 증가한다. 일반적으로 대상물질은 $\log k'$ 과 이동상의 조성과의 사이에서 이차함수적 관계를 나타낸다.

$$\log k' = A^2 + B + C \quad (1)$$

Schoenmaker들²⁶은 여러 종류의 벤젠 일치환체들이 식 (1)과 같은 관계가 있다는 것을 실험적으로 입증하였고, Jandera들²⁷도 상호작용지수(interaction index)와 열역학적 자유에너지를 도입하여 식 (2)와 같은 관계를 유도하였다.

$$\log k' = a - nX + dX^2 \quad (2)$$

여기서 X 는 이동상 중 유기조절제의 부피비이다. Jandera들²⁷은 유기조절제의 종류에 따라 d/n 비가 달라지는데 메탄올, 아세토니트릴 및 테트라하이드로푸란에서 각각 0.25, 0.31 및 0.38의 값을 갖는다고 하였다. 즉, 용매강도가 큰 유기조절제를 사용할수록 $\log k'$ 과 이동상의 조성비 간에는 선형관계가 감소

한다는 것을 알 수 있다. Lee들²⁸도 벤젠 일치환체들의 $\log k'$ 과 이동상의 조성비의 관계에서 메탄올보다 아세토니트릴의 유기조절제를 사용하였을 경우에 선형 관계가 더 짧아진다는 것을 실험적으로 관찰하였다. 그런데 유기조절제의 조성비가 약 0.3~0.8까지는 거의 직선에 가까운 경향을 나타내었다. 이 실험에서도 메탄올, 아세토니트릴 및 테트라히드로푸란의 유기조절제와 물과의 조성비를 각각 50~80%까지 변화시키면서 티오카바메이트류들의 $\log k'$ 과 이동상의 조성비와의 회귀관계를 조사하였다 (Table 3).

세 가지 유기조절제의 시스템에서 거의 모든 티오카바메이트의 $\log k'$ 이 주어진 조건내에서 조성비에 따라 선형적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. 상관계수(correlation coefficient), r 이 거의 0.999 이상의 좋은 회귀관계를 보이고 있으며, 테트라히드로푸란계에 약간의 편차가 발생하였다. 각 시스템에서 기울기를 비교하여 보면 메탄올과 테트라히드로푸란계에서는 각 티오카바메이트류 간의 기울기가 서로 다르지만 서로 비슷하게 감소하는 것을 보여주고 있다.

최적분리조건. 다성분 동시분석을 하기 위해서는 반드시 11종의 티오카바메이트를 모두 분리할 수 있는 이동상의 조건을 찾아야 한다. 이 때 용량인자 k' 의 범위는 1에서 10 이내의 범위가 타당하며, 제한된 시간내에 모든 봉우리를 분리하기 위해서는 이동상의 선택성에 변화를 주어 최적조건을 찾는 것이 바람직하다.

Table 3. Change of log *k'* with the volume fraction of various organic modifier in water

Cpd. No.	MeOH			ACN			THF		
	slope	int	r	slope	int	r	slope	int	r
1	-4.07	3.08	-0.9996	-3.16	1.94	-0.9999	-4.68	2.61	-0.9999
2	-4.63	3.69	-0.9991	-3.46	2.35	-0.9995	-3.95	2.35	-0.9899
3	-3.93	2.91	-0.9996	-3.18	1.87	-0.9996	-4.69	2.06	-0.9980
4	-4.73	3.49	-0.9970	-3.93	2.47	-0.9999	-3.33	2.03	-0.9998
5	-3.26	2.28	-0.9952	-3.94	2.42	-0.9996	-3.15	1.86	-0.9974
6	-3.04	2.05	-0.9969	-3.33	1.77	-0.9978	-2.32	1.03	-0.9893
7	-3.51	2.32	-0.9998	-3.62	2.02	-0.9995	-3.80	2.08	-0.9867
8	-3.82	2.69	-0.9997	-3.72	2.22	-0.9998	-3.30	1.87	-0.9566
9	-3.72	2.62	-0.9998	-3.68	2.15	-0.9999	-4.61	2.47	-0.9990
10	-2.71	1.39	-0.9996	-3.64	1.61	-0.9984	-3.22	1.46	-0.9975
11	-3.65	2.34	-0.9997	-3.61	1.86	-0.9985	-3.32	1.66	-0.9986

Cpd. No. : compound number.

역상 액체 크로마토그래피(RPLC)에서 이동상의 선택성에 변화를 주기 위해 Snyder가 제시한 용매의 선택성 집단 중에서 선택성에 큰 차이를 나타내는 메탄올(II 족), 아세토니트릴(VI₆ 족) 및 테트라히드로푸란(III 족)을 선택하는 것이 좋다²⁸. 이동상 중 물을 기준으로 하였을 때 유기 첨가제로서 메탄올(M), 아세토니트릴(A) 및 테트라히드로푸란(T)이 어떠한 비율로 혼합되는 것이 최적 비율인가를 찾고자 하는 실험을 혼합물 실험(mixture experiments)이라고 하다.

이러한 실험조건은

$$M + A + T = 1, M, A, T \gg 0 \quad (3)$$

을 만족시켜야 한다. 식 (3)을 만족시키는 점(M, A, T)의 집합을 (K-1) 차원 심플렉스(SIMPLEX)라고 한다²⁹. 따라서 이 실험조건에서는 2차원 심플렉스가 된다. 2차원 심플렉스는 삼각좌표를 형성하며, Fig. 1에서 볼 수 있는 것과 같이 각 꼭지점의 좌표는 (1, 0, 0), (0, 1, 0) 및 (0, 0, 1)이 되며, 중심점의 좌표는 (1/3, 1/3, 1/3)이 된다. 이러한 배열법을 심플렉스 중심 배열법(simplex centroid design)이라고 한다. 실제 이 방법을 적용시키기에 앞서서 각 꼭지점에 해당이 되는 이동상의 조건을 결정해야 한다. 가장 늦게 용리되는 No. 2의 티오카바메이트를 기준으로 최대 *k'* = 10이 되는 용매조건을 Table 3을 참조로 하여 설정한다. 이 때 꼭지점에 해당하는 이동상의 조성은 59% 메탄올, 43% 아세토니트릴

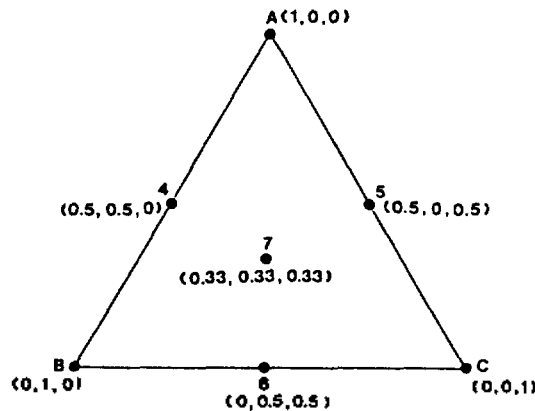


Fig. 1. Simplex design for three solvents (A, B and C) and mixtures. Values for each point are trilinear coordinates of A/B/C.

및 38% 테트라히드로푸란이었다. 이제 점 A, B, C, 4, 5, 6 및 7에 해당되는 이동상의 조성에서 크로마토그램을 얻은 후 각 봉우리의 *k'* 값을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. 7개의 조성비에서 측정한 크로마토그램의 분리도를 평가하기 위한 CRF, COF 및 ORM 방법이 제시되었다. Morgan과 Deming은 isomeric octane 혼합물을 분리하기 위한 최적조건을 찾기 위해 심플렉스법을 도입하였다. 각 크로마토그램의 분리도를 평가하기 위해 CRF를 사용하였다¹⁹.

$$CRF = \sum_{i=1}^i \log(P_i) \quad (4)$$

Table 4. Capacity factors (k') of 11 thiocarbamates in seven solvent system

No.	k'						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	5.88	4.63	9.65	6.50	4.53	3.27	4.03
2	11.22	9.73	11.63	11.70	8.09	8.41	7.83
3	4.67	3.93	5.13	4.46	4.07	3.17	3.25
4	5.16	7.02	7.45	5.74	7.69	7.37	7.23
5	4.42	5.99	7.21	5.23	6.85	7.11	6.20
6	2.34	2.96	2.17	2.24	1.65	1.77	1.67
7	2.11	3.90	3.98	2.49	3.37	3.79	2.96
8	3.30	4.63	6.46	4.05	5.65	5.47	4.10
9	3.21	3.99	6.51	3.64	6.78	5.44	4.66
10	0.72	1.04	1.92	0.74	1.29	1.26	1.02
11	2.90	2.22	3.68	3.48	5.08	4.74	3.20

I: Methanol-Water (59 : 41), II: Acetonitrile-Water (43 : 57), III: Tetrahydrofuran-Water (38 : 62), IV: I-II (50 : 50), V: I-III (50 : 50), VI: II-III (50 : 50), VIII: I-II-III (33 : 33 : 33).

여기서 P 는 봉우리분리도(peak separation)를 나타내는 값으로 인접한 두 봉우리 간의 연장선과 두 봉우리 계곡(Vally)으로부터 수직으로 연장하여 교차한 점까지의 거리(f)를 기저선으로부터 교차점까지 수직으로 연장한 거리(g)의 비로써 얻은 값이다. 두 봉우리가 기저선 분리(baseline separation)가 된다면 $P=1$ 이 되고, $CRF=0$ 이 되므로 CRF 가 0에 가까운 값을 갖을수록 분리도는 좋은 것으로 평가된다. Watson과 Carr는 CRF 에 시간의 개념을 첨가하여 5종의 phenylthiohydantoin(PTH)-아미노산 유도체를 기율기 용리로 분리하는 최적조건을 찾는 데 이용하였다²⁰.

$$CRF = \sum_{i=1}^n \ln(P_i/P_0) + a(T_M - T_L) \quad (5)$$

여기서 P_i 는 실제 얻은 봉우리의 봉우리분리도, P_0 는 원하는 봉우리의 봉우리분리도이고, T_M 은 허용된 분석시간, T_L 은 실제 분석시간이고, a 는 임의의 가중값이다. Grajch들은 크로마토그램의 분리도를 평가하는 방법으로 봉우리분리도 보다는 좀 더 친숙한 분리도(resolution)을 도입하여 새로운 COF 및 ORM법을 제시하였다²². COF는 크로마토그램의 분리도에 대한 종합적 평가방법으로 CRF 와 비슷한 식으로 표현된다.

Table 5. COF and \overline{COF} values calculated for each chromatogram in each solvent system

Solvent	COF			\overline{COF}			n
	$R_{id}=1.0$	1.2	1.5	$R_{id}=1.0$	1.2	1.5	
I	-5.78	-7.61	-9.84	0.02	0.01	0.01	9
II	-3.88	-5.70	-7.94	0.05	0.02	0.01	9
III	-3.02	-4.84	-7.07	0.09	0.04	0.02	10
IV	-0.60	-2.42	-4.65	0.74	0.15	0.04	11
V	-2.30	-4.12	-6.35	0.15	0.05	0.02	10
VI	-4.20	-6.02	-8.25	0.04	0.02	0.01	9
VII	-4.09	-5.91	-8.51	0.05	0.02	0.01	9
OPT	-0.60	-0.97	-1.41	0.74	0.52	0.34	11

I, II, III, IV, V, VI, VII: the same as Table 4. n: No. of peak found in chromatogram.

$$COF = \sum_{i=1}^k A_i \ln(R_i/R_{id}) + B(t_M - t_L) \quad (6)$$

여기서 R_i 는 i 번째 봉우리의 분리도, R_{id} 는 각 봉우리의 원하는 분리도이고, k 는 봉우리의 총 수, t_M 및 t_L 는 각각 허용된 분석시간이며, B 는 가중값이다. 식 (6)에서 시간에 대한 항은 이미 삼각 좌표의 꼭지점에서의 이동상의 조성이 k' 10인 용매강도로 조절하였기 때문에 앞쪽 항만을 고려하게 되면 다음과 같이 표현된다.

$$COF = \sum_{i=1}^k \ln(R_i/R_{id}) \quad (7)$$

이 때 $A_i=1$ 로 놓아 모든 봉우리에 대해 동일한 가중값으로 평가하였다. 식 (7)로 표현된 COF법으로 7개의 이동상의 조성에서 얻은 크로마토그램의 분리도를 평가한 값을 Table 5에 나타내었다. CRF 법과 마찬가지로 COF법도 0에 가까운 값을 가질수록 크로마토그램의 분리도는 좋은 것으로 평가된다. 한편 COF법은 모든 이동상의 조건에서 봉우리들에 대한 상대적인 용리순서가 바뀌지 않아야 하는데, 이동상의 조성에 따라 용리순서가 바뀌어서 완전히 겹치게 되면, COF법이 올바른 평가법이 될 수가 없다.

따라서 이 연구에서는 COF법은 그대로 사용되 혼합물 중의 혼합성분수와 크로마토그램상으로 나타난 봉우리의 수에 대한 평가를 고려해 줄으로써 봉우리 완전 검출에 대한 COF법의 오차를 보완해

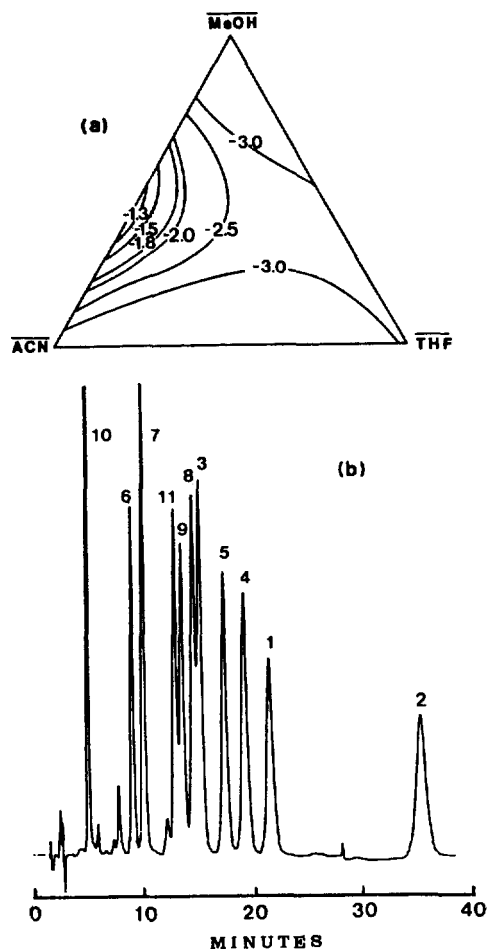


Fig. 2. COF map (a) and HPLC chromatogram (b) of eleven thiocarbamates monitored at UV 220 nm under optimum condition obtained by COF. Condition : column, Spherisorb ODS; mobile phase, methanol/acetonitrile/tetrahydrofuran/water (26.0 : 23.7 : 0.4 : 49.9); flow rate, 0.9 ml/min.

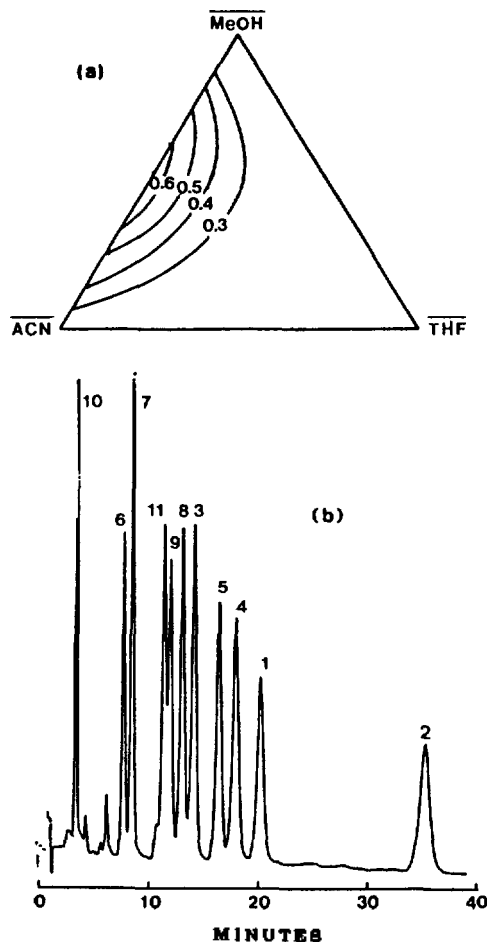


Fig. 3. $\overline{\text{COF}}$ map (a) and HPLC chromatogram (b) of eleven thiocarbamates monitored at UV 220 nm under optimum condition obtained by $\overline{\text{COF}}$. Condition : Column, Spherisorb ODS; mobile phase, methanol/acetonitrile/water (29.5 : 21.5 : 49 : 0); flowrate, 0.9 ml/min.

주는 보정된 COF(adjusted COF, $\overline{\text{COF}}$)법을 제안 하였다.

$$\overline{\text{COF}} = \frac{n}{N(1 + \text{COF}^2)} \quad (8)$$

여기서 N 은 혼합성분의 총수, n 은 크로마토그램 상에 나타나는 봉우리의 수이다. $\text{COF}=0$ 이 되고 혼합성분의 수와 크로마토그램상 나타난 봉우리 수가 일치한다면 $\overline{\text{COF}}=1$ 이 된다. 따라서 $\overline{\text{COF}}$ 는 0과 1 사이의 값을 갖으며 최대값이 1이다. 7개의 점에서

계산된 $\overline{\text{COF}}$ 법에 의한 평가를 Table 5에 나타내었다.

COF 및 $\overline{\text{COF}}$ 법에 의해 찾은 최적용매 조건은 각각 COF에서는 메탄올-아세토니트릴-테트라히드로푸란-물이 26.0 : 23.7 : 0.4 : 49.9의 조성비를 갖게 되고, $\overline{\text{COF}}$ 에서는 메탄올-아세토니트릴-물이 29.5 : 21.5 : 49.0의 조성비를 갖는다. Fig. 2에서는 COF법에 의한 contour map과 크로마토그램을 나타내었다. 크로마토그램에서 볼 수 있듯이 3번과 8번의 쌍, 9번과 11번의 봉우리쌍은 완전히 분리가 되지 않았다. Fig. 3에서는 $\overline{\text{COF}}$ 법에 의한 contour map과 크로마

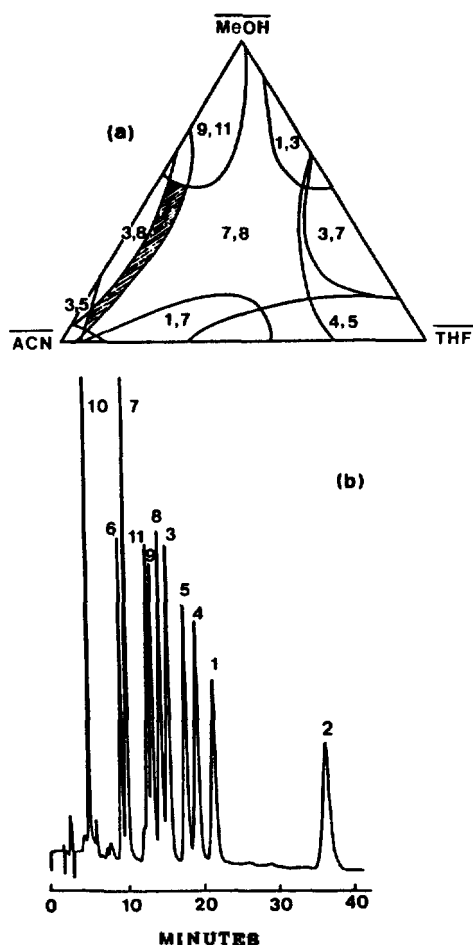


Fig. 4. Overlapping resolution mapping (ORM) (a) and chromatogram (b) monitored at UV 220 nm under optimum condition obtained by ORM. Condition: Spherisorb ODS column; mobile phase, methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran-water (16:29:2:53); flowrate, 0.9 ml/min.

로그그램을 나타내었다. COF법에서 보다 3번과 8번의 봉우리 분리도가 훨씬 좋아졌으나 여전히 9번과 11번의 분리는 완전하지 못하였다. 예상대로 $\overline{\text{COF}}$ 법에 의한 평가법에서 분리도가 더 좋은 크로마토그램을 얻었다.

한편 ORM법은 관심있는 봉우리쌍들이 7개 점의 이동상의 조성비에 따라 어떤 분리도를 나타내는가를 추적하여 평가하는 방법이다. 이 방법은 이동상의 조성비에 따른 개별적 봉우리쌍들의 분리도의 변화를 삼각좌표에 Fig. 4에서와 같이 각각 겹쳐서 그려

Table 6. Retention order of 11 thiocarbamates in each solvent system

System	Retention order										
I	10	7	6	11	9	8	5	3	4	1	2
II	10	11	6	7	3	9	8	1	5	4	2
III	10	6	11	7	3	8	9	5	4	1	2
IV	10	6	7	11	9	8	3	5	4	1	2
V	10	6	7	3	1	11	8	9	5	4	2
VI	10	6	3	1	7	11	9	8	5	4	2
VII	10	6	7	11	3	1	8	9	5	4	2

I, II, III, IV, V, VI, VII: the same as Table 4.

넣어 겹침이 없는 부분(Fig. 4에서는 빗금으로 표시되었음)이 주어진 R_f 값에서 최적 분리조건에 해당되는 영역이다. 개별적 봉우리쌍에 대한 최대 contour map은 $n\text{C}_2$ 쌍, 즉 11종의 티오카바메이트에 대해 $n\text{C}_2=55$ 쌍의 봉우리쌍이 그려지게 된다. Table 6은 7개 지점에 대한 각 봉우리들의 용리 순서를 나타낸 것이다. 용리순서에 변함없는 봉우리인 No. 2, 6 및 10을 제외하고, 분리도(resolution)가 큰 봉우리쌍을 제외하면 8쌍의 봉우리가 남으며, 이들의 이동상의 조성변화에 따른 분해능의 변화를 Fig. 4에 contour map으로 나타내었고, 그러한 조건에서 얻은 이동상의 최적조건은 메탄올-아세토니트릴-테트라히드로퓨란-물이 16:29:2:53이었으며, 이러한 조건에서 얻은 크로마토그램을 Fig. 4에 함께 나타내었다. 그 결과 $\overline{\text{COF}}$ 법에서 얻은 크로마토그램과 거의 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 용리순서가 이동상의 조성에 따라 크게 변하는 경우에 COF법보다는 ORM법이 더 효과적이라는 것을 알 수 있다. 또한 이 연구에서 새로이 제안된 보정된 $\overline{\text{COF}}$ 법도 ORM법에서 나타난 결과와 크게 다르지 않은 크로마토그램을 보였으므로 $\overline{\text{COF}}$ 법도 이러한 시스템에 매우 효율적인 평가 방법이 됨을 알 수 있었다.

이 연구는 1986년도 한국과학재단 목적기초연구비에 의하여 수행된 것인 바 재단에 깊은 감사를 드립니다.

인 용 문 헌

1. B. D. Ripley and H. E. Braun, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1084 (1983).

2. B. C. Leppert, J. C. Markle, R. C. Helt, and G. H. Fujie, *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 220 (1983).
3. E. W. Zahnow, *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 479 (1985).
4. M. D. Osselton and R. D. Snelling, *J. Chromatogr.*, **368**, 265 (1986).
5. A. Ambrus, E. Hargitai, G. Karoly, A. Fulop, and J. Lantos, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 743 (1981).
6. U. A. Th. Brinkman, A. De Kok, and R. B. Geerdink, *J. Chromatogr.*, **283**, 113 (1984).
7. M. W. F. Nielen, G. Koomen, R. W. Frer, and U. A. Th. Brinkman, *J. Lip. Chromatogr.*, **8**(2), 315 (1985).
8. M. B. Thomas and P. E. Sturrock, *J. Chromatogr.*, **357**, 318 (1986).
9. R. T. Krause and E. M. August, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 234 (1983).
10. R. C. Hall and D. E. Harris, *J. Chromatogr.*, **169**, 245 (1979).
11. L. H. Wright, *J. Chromatogr. Sci.*, **20**, 1 (1982).
12. K. Levsen and K. H. Schafer, *J. Chromatogr.*, **271**, 51 (1983).
13. G. Blaicher, W. Pfannhauser, and H. Woidich, *Chromatographia*, **13**, 438 (1980).
14. A. P. Heras and F. S. Rasero, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**(15), 3357 (1986).
15. R. T. Krause, *J. Chromatogr.*, **185**, 615 (1979).
16. R. T. Krause and E. M. August, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 234 (1983).
17. J. L. Glajch and J. J. Kirkland, *Anal. Chem.*, **55**, 319A (1983).
18. B. Sachok, R. C. Kong, and S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, **197**, 317 (1980).
19. S. L. Morgan and S. N. Deming, *J. Chromatogr.*, **112**, 267 (1975).
20. M. W. Watson and P. W. Carr, *Anal. Chem.*, **51**, 1835 (1979).
21. J. C. Berridge, *J. Chromatogr.*, **244**, 1 (1982).
22. J. L. Glajch, J. J. Kirkland, and K. M. Squire, *J. Chromatogr.*, **199**, 57 (1980).
23. R. J. Laub, J. H. Purnell, and P. S. Williams, *J. Chromatogr.*, **134**, 249 (1977).
24. 박성현, "회귀분석", 대영사, 1987, Ch. 14.
25. C. M. Sparacino and J. W. Hines, *J. Chromatogr. Sci.*, **14**, 549 (1976).
26. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet, and L. D. Galan, *J. Chromatogr.*, **185**, 179 (1979).
27. P. Jandera, H. Colin, and G. Guiiochen, *Anal. Chem.*, **54**, 435 (1982).
28. L. R. Snyder, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 223 (1978).
29. D. W. Lee, Y. W. Choi, H. J. Kim, and Y. S. Chung, *J. Kor. Chem. Soc.*, **31**, 55 (1987).