Printed in the Republic of Korea
ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 26, No. 4, 228-234, 2013
http://dx.doi.org/10.5806/AST.2013.26.4.228

Screening method for amines by derivatization reaction on TLC

Sung-Woon Choi★, Hye-In Lee and Nack-Do Sung
Department of Scientific Criminal Investigation, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received March 18, 2013; Revised May 17, 2013; Accepted June 28, 2013)

TLC 상 유도체화 반응을 이용한 아민 계 화합물의 Screening 방법

최성운★ · 이혜인 · 성낙도
충남대학교 평화안보대학원 과학수사학과
(2013. 3. 18. 접수, 2013. 5. 17. 수정, 2013. 6. 28. 승인)

Abstract: Methamphetamine is an amine-containing illegal drug and is distributed unlawfully in South Korea. Finding a rapid, convenient and semi-quantitative determination method for methamphetamine is a very important issue in the area of forensic drug testing. As an effort to develop new screening method, the reactions between three organic compounds which are structurally similar to methamphetamine and N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy) succinimide (FMOC-NHS) were performed on silica gel (SiO_2) TLC plates. Three reference compounds were synthesized and used for the identification, comparison and study of the limit of detection (LOD) of the products obtained from a direct reaction on a TLC plate. As a result, FMOC-NHS as a derivatization reagent generated compounds containing highly UV-active functional groups on the TLC plate after reacting with primary- and secondary amines. In the experiment 2D the LOD of amines was in the range of 0.045 and 0.01 mg/mL (2 μL/spot), and in 1D the LOD was in the range of 0.002 and 0.007 mg/mL (2 μL/spot). The LODs of the compounds tested were dependent on the concentration of the derivatizing reagent.

요 약: 국내에서 불법 유통 되거나 남용되고 있는 methamphetamine은 아민을 함유한 불법약물로서 그에 대한 신속하고 용이한 동정 및 정량적인 분석 방법은 불법약물 검사의 중요한 이슈가 되어왔다. 새로운 screening방법을 모색하기 위해 methamphetamine과 구조적으로 유사한 3종의 유기 화합물을 silica gel (SiO_2) TLC상에서 N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (FMOC-NHS)와 반응을 시켰다. TLC상 반응 생성물을 일반 유기합성 경로로 합성한 대조물질과 비교 · 확인한 다음, 이 방법의 검출한계(Limit of detection)를 조사하였다. 실험결과 유도체화 시약으로 사용한 FMOC-NHS는 TLC상에서 1차 및 2차 아민과 반응하여 UV-active한 화합물을 생성시키는 것을 확인하였다. 2D TLC 실험에서는 0.045-0.01 mg/mL (2 μL per spot), 그리고 1D co-spot TLC 실험에서 0.002-0.007 mg/mL (2 μL per spot)의 검출한계는 유도체화 시약의 농도에 대한 의존성을 나타내었다.

Key words: TLC, derivatization with FMOC-NHS, LOD, amphetamine, UV.

★ Corresponding author
Phone : +82-(0)42-821-5294 Fax : +82-(0)42-822-5236
E-mail : schoi@cnu.ac.kr

1. 서 론

한미 FTA 및 아시아국가 FTA 체결로 인한 수출입 증대와 원어민 강사들에 의한 국내 마약류 밀반입 증가에 따른 중독 사범의 꾸준한 검거율 증가는 마약류의 관리 및 검색에 대한 국가차원의 대응에도 불구하고 불법 마약류 밀수 및 마약사범의 단속 건수가 줄어들지 않고 있다.[1,2]

이들 마약류에 대한 검출법은 크게 면역분석법(Immunoassay)을 사용한 예비실험(Screening test)과 본실험(확인실험, Confirmation test)으로 분류된다. 현장에서는 일반적으로 정성적 감도(Qualitative sensitivity)가 높은 면역분석법을 사용하여 음성과 양성으로 판단한다. 양성인 시료에 대하여는 감정기관에서 GC/MS 등을 사용하여 확인 실험을 한다. 확인 실험에서는 주로 chromatography를 사용하여 불법약물을 순수하게 분리한 후, 특정한 검출기(예, 질량분석기)를 사용하여 각 물질의 구조 확인 및 농도를 측정한다. 화합물 분리를 위해 사용하는 chromatography는 HPLC, LC, GC 및 TLC 등이 있다. 불법 약물류의 분리는 신속, 정확 및 정밀성이 요구되므로 분리하려는 시료의 성질에 따라 분리방법이 신중하게 선택되어져야 한다.[3]

TLC는 경제적이고 간편하며 빠르게 활용할 수 있는 분석 기법 중의 하나로, 현장에서 쉽게 사용할 수 있다. 또한, 감정기관에서 GC/MS를 사용하기 전 보조 실험단계에서 물질의 혼합체를 각 성분으로 분리한 후 확인하는 방법으로,[4,5] 그리고 법과학 분야에서 불법약물 분석, 문서감정, 화학무기 및 폭발물 등의 감정에 많이 사용된다.[6-8] 그러나 TLC법은 일반적으로 감도와 특정성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다. 이를 극복하기 위하여 High Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC), 이동상의 변경, 표준물질과의 비교 및 특이한 정색시약 등을 사용하는 방법 등으로 감도와 특정성을 다소 높일 수 있지만 여전히 그 수준은 다른 실험법에 비해 낮은 편이며 실제 법과학(Forensics) 분야에서도 사용빈도가 아주 높지 않은 편이다.[9-12]

최근, 국내외에서 많이 남용되는 대표적인 불법약물로는 아민을 함유한 amphetamine, methamphetamine (필로폰, "히로뽕", *Fig.* 1), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy, MDMA)등이 있다.[2,13,14] 이들은 아민 작용기(Amine Functional Group)를 가지고 있어 화학적으로 1, 2 및 3차-아민으로 구분된다. 이들에 대한 확인실험에 사용되는 GC/MS는 분리능과 감도가 매우 높지만 amphetamine류에 대한 특정성(specificity)이 떨어지는 단점을 가지고 있다. 이러한 보완을 위해서는 분석물의 물리화학적 성질을 변경시키기 위한 적절한 시약과의 유도체(derivative)가 선행되어야하고 간혹 시료 전처리가 요구되는 점으로 현장성이 떨어진다. 또한, 장비가 고가이고, 기기조작이 복잡하여 고가의 장비 유지비 및 장비와 작동에 대한 교육과 숙련된 기술이 필요하다.[3,6,7] 이들 amphetamine류 화합물의 분석 시 HPLC-UV 검출기를 사용하는 방법이 있으나, 화합물 자체의 UV에 대한 낮은 흡수로 낮은 농도에서 검출이 어렵고 또한, 높은 극성으로 인하여 깨끗한 분리가 어려운 단점이 있다. 따라서 이들의 검출한계를 낮추고, 순수한 column상의 분리를 위하여 column 전후에 다수의 유도체화 시약을 이용한 유도체화 반응을 도입하는 개선된 방법이 사용되고 있다.[15-20]

화합물 분석을 위해 기존의 유도체화 반응을 선정할 때 column분리 전후에 분석물에 대한 추가적인 반응을 위한 시료 전처리, 반응시간의 소요, 고가의 시약, 유도체화 시약의 분해, 높은 반응온도 및 반응 부산물 생성 등의 분석에 영향을 미칠 수 있는 요소들을 신중히 고려하여야 한다. 유도체화 시약 중에서, phenyl isothiocyanate 및 유사 isothiocyanates 그리고 dansyl chloride는 HPLC 및 TLC, 그리고 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl, *Fig.* 1) 및 naphthoquinone류 등은 HPLC를 사용하여 amphetamine류를 분석하는 데 사용된다.[15-22]

이들은 대부분 반응 수득률이 매우 높은 시약이지만 반응 중 생성되는 부산물을 중화시키기 위해 과량의 알칼리를 사용해야하며, 반응 중 시약의 안정성이 매우 중요하고 반응 부산물이나 시약 분해산물이 반응 유도체의 분리에 영향을 미치지 않고 유도체는 안정적이어야 한다. FMOC-Cl는 아민 화합물을 위한 유도체화 시약으로서 암페타민에 fluorenyl-기가 결합된 다소 안정적이고 UV-active한 유도체를 생성하는 시약으로 알려져 있으나 과정은 다소 복잡하고 많은 시간

Fig. 1. Chemical structures of methamphetamine and derivatizing reagents 9-Fluorenymethyl chloroformate (FMOC-Cl) and N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl oxy)succinimide (FMOC-NHS).

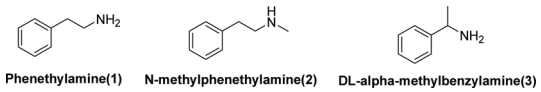

Fig. 2. Chemical structures of phenethylamines used in the study.

이 소요되며 시약의 낮은 안정성 및 반응 부산물의 과량 생성과 미반응 시약의 다량 존재 등으로 TLC에 적용하기에는 용이하지 않다.[23] 기존에 알려진 직접적인 TLC상 합성 및 분석에 관한 연구로 fluorescamine을 이용한 sympathomimetics와 co-spot의 방법으로 유도체화 반응을 통한 확인 및 반정량 방법,[24] 친환경적 solvent-free reaction을 이용한 반응,[25] Microwave를 이용한 alkylation반응[26] 등이 알려졌는데, 직접적인 TLC상 합성 및 분석에 대한 적용 가능성이 시사 되었으나 차후 이에 대한 연구는 저조한 상태이다. 또한 FMOC-Cl과 구조 및 화학적으로 유사한 유도체화 시약 FMOC-NHS (*Fig.* 1)가 TLC를 사용한 amphetamine류 화합물의 분석에 사용되었다는 사실은 보고된 바 없다.

본 연구에서는 FMOC-NHS (*Fig.* 1)와 아민을 함유한 amphetamine류에 대한 유도체화 반응을 이용하여 현장 적용은 물론, 감정기관에서 사용할 수 있는 빠르고 용이한 screening방법으로서 TLC상에서 직접적인 유도체화 시약으로서의 활용 가능성을 타진하기 위하여 amphetamine류 화합물과 유사한 구조를 가진 3 가지 phenethylamine류 화합물(*Fig.* 2)과 대조물질을 합성하여, silica gel TLC상에서의 유도체화 반응성을 비교하고 검출한계(LOD) 농도를 탐색하였다. 또한, 유도체화 반응에 영향을 미칠 수 있는 시약 농도의 적정화를 시도하였다.

2. 실 험

2.1. 실험 방법

2.1.1. 시약, 기구 및 일반방법

TLC상 유도체화 반응에 사용된 시약 FMOC-NHS (*Fig.* 1)는 Acros(USA)사에서 구입하여 tetrahydrofuran (이하 THF)에 적정농도로 녹여 점적(1D co-spot) 혹은 spray방법(2D)으로 TLC상에 적용하였다. 시료로 사용된 3종의 아민함유 화합물(**1-3**; *Fig.* 2), phenethylamine, N-methylphenethylamine, DL-α-methylbenzylamine은 Sigma-Aldrich사에서 free base상태로 구입하여 사용하였다. 통상 적정농도의 시료 및 유도체화 시약 (1D co-spot)은 2 μL (per spot)의 양으로 실험하였다. Silica gel TLC plate (20 × 20 cm silica gel 60 F254, Aluminium plate)는 Merck(Germany)사의 제품으로 형광물질이 도포되어 있어서 UV 조사 시 강한 형광을 내는 제품을 사용하였다. Acetone 용매는 Jin Chemical, 전개용매로 사용된 메클로로메탄과 메탄올은 Burdick & Jackson사, 아민을 위한 보조 전개용매로 사용된 암모니아 용액(28%)은 Junsei (Japan)사에서 각각 구입하였으며 모든 시약들과 용매들은 상품화 된 것들을 구입하여 추가적인 정제 없이 사용하였다. 유도체화 반응 전과 후, 아민 화합물과 생성 유도체의 TLC상 존재 및 위치의 확인에는 UV lamp (254 nm, Ultra-Violet Product, USA)를 사용하였다. 합성을 위해 사용된 실험기기로는 Rotary Evaporator N-1000 (EYELA, JAPAN), DOA-P704-AC/Vacuum & Pressure Pump (GAST, U.S.A), 400 MHz FT-NMR (Akishima, Japan)을 사용하였다. 모든 ^{1}H NMR spectra는 $CDCl_3$를 사용하였을 경우, 내부 표준물질 tetramethylsilane (TMS)의 피크에 준하여 δ 단위 (ppm)로 확인하였다. CD_3OD 용매내 시료들에 대하여는 3.30 ppm, 그리고 d_6-DMSO 용매중의 시료들에 대하여는 2.49 ppm에서 나타나는 5중선의 중심선을 기준선으로 하여 확인하였다. 짝지움 상수(J)들은 hertz (Hz) 단위로 확인하였다. 질량분석 스펙트럼(MS)은 Waters의 ACQUITY UPLC, Micromass Quattro micro™ API기기를 사용하여 얻었다. Column chromatography는 silica gel (Merck, grade 60, 230-400 mesh)을 사용하여 이루어졌다.

2.1.2. 대조 화합물(R1, R2 및 R3)의 합성

기존에 알려진 구입이 불가능한 carbamate형의 대조물질(**R1**, **R2** 및 **R3**)의 합성과정은 *Fig.* 3에 제시하였다. THF용액 내 각 아민 시료와 FMOC-NHS (1.2 당량)의 혼합물을 4시간 동안 실온에서 저어주었다. 반응액의 용매를 농축한 후, 잔사는 cyclohexane 용매내 30% ethyl acetate를 사용하여 silica gel column chromatography에 의하여 정제하였으며 백색 고형상 화합물을 얻었다. 모든 반응에서 100%에 가까운 수득률을 보였으며 TLC, ^{1}H-NMR 및 LC-MS(ESI) 등의 방법으로 합성된 대조물질들이 알려진 화합물과 동일함을 확인 하였다.[27-31]

2.1.3. 유도체화 및 LOD결정

3가지의 아민 시료 화합물(**1-3**)을 각각 THF 용액에 10 mg/mL의 농도로 저장용액을 만든 다음에 적정농도로 희석시킨 시료를 TLC plate (5 × 10 cm, 1D;

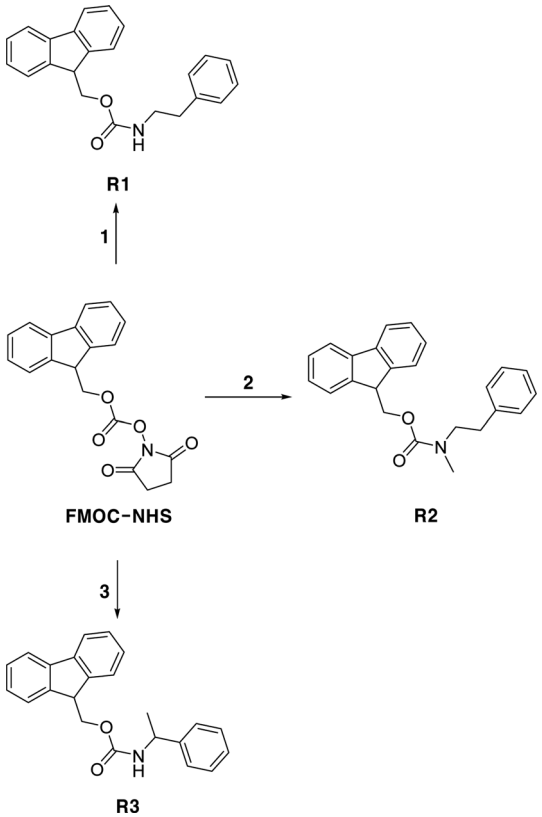

Fig. 3. Synthetic scheme of reference compounds **R1**, **R2** and **R3**.

10 × 10 cm, 2D)에 점적한 후, THF에 녹여 제조된 유도체화 시약 5 mg/mL의 저장용액을 적절한 농도의 동일 용매로 희석시키고, 시료 spot상에 점적(1D co-spot) 또는 spray 방법(2D)으로 반응시켰다. 적절한 용매 조건에서 전개한 후, 건조 시키고, 254 nm UV light로 spot을 확인하였다. 1D 및 2D에서의 LOD 농도 결정은 혼합물이 아닌 단일시료 상태에서 반응시켜 결정하였다. 모든 TLC plate상의 실험은 3회 이상, 상이한 날짜에 실행하여 spot의 존재가 대조물질과 동일 Rf값에서 확인된 경우의 농도(mg/mL, 2 μL per spot)로 결정하였다. 화학적으로 다른 3종 시료의 유도체화 시약에 대한 상대적인 반응성을 검토하고자 혼합물의 상태로 반응(**S**, 1D co-spot, *Fig.* 4) 혹은 분리 후 반응(2D spray, *Fig.* 4)을 시켰다. 비교를 위하여 유도체화 시약(**F**)과 대조 화합물(**R1-R3**)을 적절한 농도로 THF에 녹여 반응시의 시료와 동일선상에 각기 점적한 후 전개하였다.

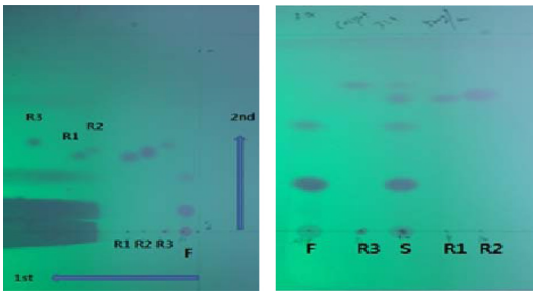

Fig. 4. Photographs of actual silica gel 2D (left) and 1D (right) TLCs showing spots of derivatized phenethylamines (**1-3**) after reaction with derivatizing reagent (FMOC-NHS, **F**) with spots of reference compounds (**R1**, **R2** and **R3**), **F**, S, co-spot of sample **1**, **2**, **3** and **F**; 1st, first development; 2nd, second development.

2.1.3.1. 1D co-spot 실험

3 가지 시료의 THF 저장용액을 각각 적절한 농도로 희석한 후 TLC plate에 개별적으로 혹은 혼합물로 점적하고 동일 spot상에 일정한 농도의 유도체화 시약을 점적하여 약 10분간 실온에서 반응시킨 후 건조한 다음에 hexane:ethyl acetate=3:1 비율의 전개용매에서 전개하였다. 전개한 TLC plate를 건조시킨 후, 254 nm UV light로 spot을 확인하였다.

2.1.3.2. 2D 실험

3 가지의 시료의 저장용액을 적절한 농도로 희석하여 TLC plate (10 × 10 cm) 우측하단(원점)에 점적한 후(**1-3**의 혼합물, 반응성 시험), dichloromethane: methanol: ammonium hydroxide=9:1:0.1 비율로 제조된 전개용매 조건에서 1차 전개(1st, *Fig.* 4)하였다. 잔류 전개용매와 ammonium hydroxide를 제거한 후, 254 nm UV light로 spot을 확인하였다(LOD 결정의 경우, 시약의 분무위치를 결정하기 위하여 UV 조사하에서 육안으로 확인 가능한 농도의 시료를 TLC판상 반대편에 점적하여 이와 Rf값이 유사한 부근에 분무하였다). FMOC-NHS를 THF에 녹인 적정 농도(0.5 mg/mL)의 시약을 분무하여 약 10분간 실온에서 반응시킨 후 건조하고 2차 전개(1D의 전개용매와 동일, 2nd, *Fig.* 4)후, TLC plate 상의 전개용매를 제거한 다음에 254 nm UV light로 spot을 확인하였다. 최종 전개 결과를 비교하고자 2차 전개 전 1차 전개 후 전개된 시료와 동일선상(X 축)에 유도체화 시약(**F**, *Fig.* 4)과 대조 화합물(**R1**, **R2** 및 **R3**, Fig. 4)을 점적하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유도체화 반응

일반적으로 약물에 대한 이화학적인 분석실험에는 색상반응(Color test), TLC상 분리 및 발색 시약에 의한 spot 확인,[32] GC 및 MS 등이 사용된다.[3,7] 특히, 현장과 감정기관에서 마약류 확인 차원의 예비실험으로 빠르고 간단하게 사용할 수 있는 TLC 용 유도체화 시약으로서 FMOC-NHS (*Fig.* 1)의 amphetamine류 화합물에 대한 활용 가능성을 알아보기 위하여 3 가지 phenethylamine류 화합물(*Fig.* 2)과 silica gel TLC상에서의 직접적인 유도체화 반응성을 1D와 2D의 방법으로 실행하여 대조 화합물(**R1**, **R2** 및 **R3**)과 비교한 실험 결과를 *Fig.* 4에 제시하였다. 먼저, 2D 실험에서 시료 혼합물(**1-3**)을 1차 전개로 분리한 경우, 이동상 중 보조용매 ammonium hydroxide를 사용하여 끌림 현상을 감소시키고, 강하게 UV-active한 fluorenyl-기를 amino-기에 빠르고 용이하게 결합시키기 위하여 FMOC-NHS를 분무하여 반응 시켰다. FMOC-NHS는 아민과 반응 시 염기(base)를 필요로 하지 않으며 상온에서 짧은 시간에 높은 수득률을 보인다. 1D co-spot 실험에서 TLC상 시료 혼합물의 분리 전, 유도체화 시약(FMOC-NHS)에 의한 반응 결과를 *Fig.* 4(**S**, 우측)에서 확인할 수 있다.

2D 실험에서는 분무 시약의 농도를 알아 본 결과(data not shown), 5 mg/mL, 1 mg/mL 및 0.5 mg/mL에서 차이가 없었으며 고농도(5 mg/mL)를 사용할 경우에는 미반응 시약의 과량존재 및 시약 분해물 등으로 인하여 강한 밴드(band)가 TLC상에서 관찰되었다. *Fig.* 4의 크로마토그램은 농도 0.5 mg/mL의 시약을 사용한 결과(좌측)를 보인 것이다. 1D 실험에서 유사한 Rf값으로 분리가 어려웠던 유도체화 반응 생성물로서 **R1**과 **R2**는 비교적 분리가 진행되어 관찰이 가능하였다. 1D와 2D 실험에서 **R2**에 해당하는 spot은 항상 약하게 관찰되었다. 이는 다른 시료, **1**과 **3**은 1차-아민으로 상대적으로 2차-아민인 시료, **2**가 동일 조건에서 반응성이 낮은 결과로 보인다. 이는 전자 밀게인 N-methyl group으로 인한 N 원자 상 음하전의 크기에 따른 친핵성 반응보다는 입체장애의 영향이 비교적 크게 작용한 것으로 사료된다. Benzylamine인 시료 **3**은 전자 끌게인 benzyl-기로 인하여 시료 **1**, **2**에 비해 상대적으로 염기성(basicity)은 떨어지나 입체장애(**2, 3** > **1**)가 비교적 작게 미치기 때문에 현 조건에서는 유도체화 반응이 무리없이 진행된 것으로 보여진다. 1D 실험에서 생성된 spot들의 상대적인 강도를 육안으로 확인한 결과, **R1** > **R3** > **R2**의 순이었다(data not shown). 2D 실험에서 **R1**에 해당하는 spot이 **R3**에 해당하는 spot과 유사한 강도를 나타내는 것은 1차 전개에서 서로 분리가 잘되었고 지정된 시약농도의 조건에서 유사한 반응성을 보인 결과로 보인다.

3.2. 검출한계(LOD)

검출한계의 측정은 주로 생체시료와 같이 시료가 매우 낮은 농도로 존재하는 경우, 시료의 양이 지극히 적은 경우, 그리고 분석을 필요로 하는 물질의 존재 여부를 판단하여야 할 경우에 고려하여야 하는 매우 중요한 사항으로 TLC를 사용할 경우, 인식되는 반응의 감도가 사용하는 다른 기기의 분석기법에 비하여 보편적으로 낮은 편이라는 사실이 잘 알려져 있다.[3-5] 그러나 본 실험에서는 유도체화 시약에 의한 직접적인 TLC상 반응을 통하여 검출한계가 알려진 바 없는 시료를 적정한 농도로 희석한 후, 방해물질이 없는 순수한 상태에서 얻은 유도체화 반응 생성물을 UV 조사 하에서 관찰한 결과로부터 확인된 시료의 최저 검출농도(mg/mL, 2 μL per spot)를 *Table* 1에 정리하였다. 먼저, 대부분의 시료는 UV 조사 하에서 0.6 mg/mL까지 관찰이 가능하였는데 1 mg/mL의 농도까지 쉽게 확인되었으나 그 이하의 농도에서는 주의 깊은 관찰이 요구되었다. 2D 실험의 검출한계 농도는 0.01~0.045 mg/mL로 1D 실험시의 0.002~0.007 mg/mL보다 전반적으로 높은 농도에서 시료를 관찰할 수 있었다. 이 결과는 유도체화 반응 전에 비하여 2D 실험의 경우에 13 배에서 60 배, 그리고 1D 실험의 경우에 90 배에서 300 배에 이르는 향상된 검출결과를 보여준다. 2D 실험의 검출한계의 농도가 높은 이유는

Table 1. Lower limits (mg/mL) of detection[a)] of phenethylamines (**1-3**) chromatographed on silica gel TLC before and after derivatization as co-spotted (1D) or sprayed (2D) with derivatizing reagent (FMOC-NHS)

No.	2D	1D			
	0.5[b)]	0[b)]	1.25[b)]	2.5[b)]	5[b)]
1	0.045	0.6	0.003	0.002	0.002
2	0.025	0.6	0.007	0.006	0.005
3	0.010	0.6	0.007	0.006	0.002

[a)] Determined visually under UV_{254} (n=3)
[b)] Concentration of FMOC-NHS in THF as mg/mL, 1D; 2 μL per spot, 2D; spray method, absolute amount not available.

1차 전개 시, 시료 spot의 끌림으로 밴드(band)가 넓게 형성되어 유도체화 반응 후, 2차 전개가 이루어지는 동안에 spot이 희석되어 넓게 퍼지므로 시료 물질의 확인이 불가능한 것으로 보인다. 2D 실험의 경우에는 benzylamine (**3**)이, 그리고 1D 실험의 경우에는 1차-아민, phenethylamine (**1**)이 각각 최저의 검출한계를 나타내었다.

1D 실험의 경우, 시약 농도에 의한 차이를 볼 수 있었으며 유도체화 시약의 농도가 낮을수록 전반적으로 검출한계 농도가 증가되는 경향이었다. 시료 **1**은 비교적 시약의 농도에 의한 영향이 낮았고 시료 **3**이 가장 큰 영향을 받았음을 나타냈다. 비록 동일 시료를 사용하지 않아 직접적인 비교는 불가능하나 통상 알려진 여러 방법(색상 반응, TLC상 발색 및 유도체화, 등)들은 UV에 비해 10 배 이상의 검출한계 향상을 보이지 않았으나, 현재의 방법은 100~300 배에 가까운 검출한계를 보여준다.[22] 또한, 이 방법은 간편하고, 빠르게 결과를 도출할 수 있고 UV lamp 이외의 장비는 필요치 않다. 물론 현재의 방법으로 향상된 검출한계 농도는 면역분석법에 비해 매우 높으나 분석물질 유도체의 TLC상 분리 후 대조물질과의 비교를 통해 특정성을 다소 높일 수 있고, 차후 기존에 알려진 다른 유도체화 시약을 제시된 방법으로 반응하여 감도를 증가시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 최근 TLC상 분리 후 여러 가지 종류의 다양한 시약과의 반응을 통한 감도의 획기적인 증가는 아직도 TLC를 사용한 방법이 큰 잠재력을 가지고 있음을 보여주는 예이다.[33] 비록 현실에서 관련법의 제약으로 인하여 실제의 amphetamine류 시료 물질을 사용하지 못하였으나, 이들 마약류를 사용하여 실험할 경우 결과는 유사할 것으로 예측된다. 차후, 관련 기관의 승인 하에 실제 아민함유 마약류에 대한 실험들이 진행되어야 할 것이다. 또한, 혼합물의 형태로 직접적인 TLC상 반응(1D 혹은 2D)을 통하여 앞서의 실험 예와 유사한 방법으로 다양한 아민류 화합물은 물론, 2차-아민의 반응성이 감소되지 않는 특정한 시약의 검출한계에 미치는 전개용매의 조성 및 유사물질과의 반응을 통한 선택성 확인 실험에 관련한 연구가 이루어져야 하겠다.

3.3. 화합물의 Rf값

Silica gel TLC plate상에서 전개된 아민류 시료 화합물들과 대조 화합물들의 이동에 따른 고유수치(Rf값)를 UV 254 nm에서 육안 관찰한 결과는 *Table* 2와 같다. 아민 함유 시료의 경우, 과량으로 점적되어 전개할 경우에는 끌림 형상이 심화되고, 시료 용매의 TLC상 잔존여부, 보조용매로 쓰인 ammonium hydroxide의 휘발성으로 오차가 심하게 나타났다. 그러므로 아민 계 화합물에 대한 Rf 수치는 물질에 대한 대략적인 확인 수단으로 사용되어야 한다고 판단된다.[32] Silica gel TLC plate상에서는 1차, 2차-아민(**1**, **2**)은 유사한 속도로 전개되어 구분이 어려웠으나 benzylamine (**3**)은 다소 빠르게 전개되어 구별이 가능하였다. 이와 유사하게 1차, 2차-아민의 유도체 대조 화합물(**R1**, **R2**)도 역시 유사한 속도로 전개되어 구분이 어려웠으나 benzylamine의 유도체 대조 화합물(**R3**)은 다소 빠르게 전개되어 구별이 가능하였다(*Fig.* 4).

Table 2. Rf[a)] values of phenethylamines (**1-3**) and reference compounds (**R1-R3**) chromatographed on silica gel TLC plate under UV_{254}

No.[b)]	Phenethylamines			Reference compounds		
	1	2	3	R1	R2	R3
I	0.18	0.2	0.38	-	-	-
II	-	-	-	0.42	0.43	0.49

[a)] Determined visually under UV at 254 nm, other solvent systems were not investigated
[b)] I; dichloromethane: methanol: ammonium hydroxide=9:1:0.1, II; hexane: ethyl acetate=3:1 as developing solvent system.

이상과 같은 결과에 따라서 차후에는 alumina TLC의 사용, 시약농도의 변화, 시약의 용매의 변경 및 다른 유도체화 시약의 적용에 따른 영향 등에 대하여 추가된 실험 결과를 보고하고자 한다.

4. 결 론

아민을 함유한 마약류에 대한 용이한 screening방법의 개발을 위한 선행실험으로서 silica gel TLC상에서 amphetamine류와 유사한 phenethylamine류 화합물(**1-3**)과 유도체화 시약(FMOC-NHS)과의 직접적인 반응 및 이를 이용한 검출한계를 평가한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. FMOC-NHS는 아민함유 화합물 **1-3**과 실온에서 빠르게 반응하여 강하게 UV-active한 fluorenyl 유도체를 생성하였으나 이들이 혼합물의 상태로 반응할 경우에는 경쟁성을 나타내므로 주의가 필요하였다.

2. 1D 실험에서 검출한계 농도(0.002~0.007 mg/mL)는 2D 실험에서의 검출한계 농도(0.01~0.045 mg/mL)보다 낮았으며 검출한계는 유도체화 시약의 농도에 의존성을 보였다.

3. 유도체화 반응 후, UV에 의한 검출한계는 유도체화 반응 전에 비하여 2D 실험의 경우에는 13~60 배, 그리고 1D 실험에서는 86~300 배의 향상을 각각 나타내었다.

4. 유도체화 시약으로서 FMOC-NHS는 silica gel TLC상에서 아민함유 화합물에 대해 빠르고 간편하게 검출한계를 향상시킬 수 있는 가능성을 보였다.

감사의 글

이 연구는 충남대학교 학술 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 강규복, '마약류범죄에 대한 경찰수사 효율화 방안에 관한 연구' 석사학위논문, 원광대 행정대학원, 2008.
2. 조성권, 마약연구, **3**, 1-12 (2006).
3. B. Levine, In 'Principles of Forensic Toxicology', 3rd Ed., AACCPress, Washington DC (2010).
4. E. Hahn-Deinstrop, In 'Applied Thin-layer chromatography', 2nd Ed., WILEY, Germany (2007).
5. E. Stahl, In 'Thin-layer chromatography', 2nd Ed., Springer-Verlag, Berlin (1969).
6. R. Liu and D. Gadzala, In 'Handbook of drug analysis: applications in forensic and clinical laboratories', p367, Washington, DC, American Chemical Society (1997).
7. R. Ad. Zeeuw, J. Hartstra and J. P. Franke, *J. Chromatogr. A*, **674**, 3-13 (1994).
8. R. L. Brunelle and M. J. Pro, *JAOAC*, **55**, 823 (1972).
9. K. E. Toole, S. Fu, G. S. Ronald, N. Kraymen and S. Taflaga, *Microgram J.*, **9**(1), 27-32 (2012).
10. S. Udenfriend, S. Stein, P. Bohlen, W. Dairman, W. Leimgruber and M. Weigele. *Science,* **178**, 871-872 (1972).
11. N. Kato and A. Ogamo, *Sci. Justice,* **41**(4), 239-244 (2001).
12. G. Gubitz and R. Wintersteiger, *J. Anal. Toxicol.,* **4**(3), 141-143 (1980).
13. S. B. Gock and V. A. Skrinska, *Clin. Lab. Sci.,* **18**, 114-118 (2005).
14. S. B. Gock and V. A. Skrinska, *Clin. Lab. Sci.,* **18**, 119-123 (2005).
15. S. Wawrzycki, E. Pyra and B. Wawrzycki, *J. Planar Chromatogr.,* **14**, 21-23 (2001).
16. P. J. Ryan, R. Lesicki and J. Roberts, *J. Chromatogr.,* **465**, 448-450 (1989).
17. R. M. Linares, J. H. Ayala, A. M. Afonso and V. Gonzalez, *Analyst*, **123**, 725-729 (1998).
18. C. R. Clark and M. M. Wells, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 332-339 (1978).
19. B. M. Farrell and T. M. Jefferies, *J. Chromatogr.*, **272**, 111-128 (1983).
20. P. Leroy, A. Nicolas and A. Moreau, *J. Chromatogr.*, **282**, 561-569 (1983).
21. G. Maeder, M. Pelletier and W. Haerdi, *J. Chromatogr.,* **593**, 9-14 (1992).
22. D. Kazmierczak, W. Ciesielski and R. Zakrzewski, *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, **29**, 2425-2436 (2006).
23. G. Maeder, M. Pelletier and W. Haerdi, *J. Chromatogr.*, **593**, 9-14 (1992).
24. R. Wintersteiger, G. Giibitz and A. Hartinger, *Chromatographia,* **13**(5), 291-294 (1980).
25. J. M. Stoddard, L. Nguyen, H. Mata-Chavez and K. Nguyen, *Chem. Commun.,* 1240-1241 (2007).
26. L. Williams, *Chem. Commun.,* 435-436 (2000).
27. Z. Harduf, T. Nir and B. J. Juven, *J. Chromatogr.,* **437**(2), 379-86 (1988).
28. N. Jinkui and D. S. Lawrence, *J. Biol. Chem.*, **272**(3), 1493-1499 (1997).
29. H. Kazuhito, K. Mizuho, K. Michiko, F. Miho, T. Shohei and K. Munetaka *Synthesis*, **12**, 1931-1933 (2006).
30. M. Shimizu and M. Sodeoka, *Org. Lett.*, **9**(25), 5231-5234 (2007).
31. H. M. L. Davies and V. Chandrasekar, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**(12), 2197-2199 (2002).
32. S.-W. Choi, S.-G. Lee and H.-I. Lee, *Kor. J. Sci. Crim. Investig.,* **6**, 265-270 (2012).
33. N. Kato, S. Fujita, H. Ohta, M. Fukuba, A. Toriba and K. Hayakawa, *J. Forensic. Sci.*, **53**(6), 1367-1371 (2008).