

## The preliminary evaluation of semi-quantitative analysis by *in situ* pre-chromatographic derivatization of amines and image analysis in TLC

Yonsu Kim and Sung-Woon Choi<sup>★</sup>

Department of Scientific Criminal Investigation, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received December 24, 2014; Revised March 6, 2015; Accepted February 9, 2015)

### TLC상 분리 전 직접적 유도체화 반응과 이미지 분석을 통한 아민 화합물의 반정량분석을 위한 선행평가

김연수 · 최성운<sup>★</sup>

충남대학교 평화안보대학원 과학수사학과

(2014. 12. 24. 접수, 2015. 3. 6. 수정, 2015. 2. 9. 승인)

**Abstract:** A preliminary experiment was performed to develop a fast, convenient, and economical semi-quantitative method of analyzing amphetamine-like amines from images of derivatives. These were generated from the reaction (*in situ*, co-spot) of three amphetamine-like compounds with three derivatization reagents on a TLC plate. The attempt was made to optimize the reaction conditions for an efficient derivatization reaction, and TLC images taken by a digital camera were analyzed using two types of image analysis program (CP Atlas 2.0 and ImageJ) for repeatability (RSD, %) and linearity ( $R^2$ ). Then, their results were compared. For efficient derivatization, the reaction conditions needed to be modified. The results of image analysis of each of the samples at two different concentrations (0.5 mg/mL and 0.01 mg/mL) showed that the RSD values for reaction repeatability were in the range of 0.69-5.50%. From the calibration curves between the area of the derivative and the concentration of amines, the  $R^2$  values ( $R^2 > 0.9906$ ) for good linear correlation were found to be high, in a concentration range of 0.1-0.005 mg/mL of amines. In addition, the two programs demonstrated little difference in the analysis of repeatability and linearity of the derivatization, so that the current method has the potential to be used for the semi-quantitative analysis of amines.

**요 약:** TLC ( $\text{SiO}_2$ ) 상에서 3가지 유사 암페타민 류 아민 화합물과 3가지 유도체화 시약 사이의 반응으로부터 얻어진 아민유도체의 이미지 분석으로부터 암페타민 류 화합물에 대한 신속하고 경제적인 반정량적인 분석방법을 제시하기 위하여 선행 실험을 하였다. TLC상 직접적인(*in situ*, co-spot) 유도체화 반응의 적정화를 시도하였고 그 TLC 결과물들을 디지털카메라로 촬영하여 이미지를 얻은 후 2가지의 이미지 분석 프로그램(CP Atlas 2.0 및 ImageJ)에 적용하여 재현성(RSD; %)과 상관성( $R^2$ )을 각각 확인 및 비교하였다. 그 결과, 반응 조건에 대한 조정이 필요하였고(반응 온도 등) 각 시료별 2가지의 농도(0.5 mg/

<sup>★</sup> Corresponding author

Phone : +82-(0)42-821-5294 Fax : +82-(0)42-822-5236

E-mail : [schoi@cnu.ac.kr](mailto:schoi@cnu.ac.kr)

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

mL 및 0.01 mg/mL)에서 반응의 재현성은 0.69~5.50% 범위이었으며 반응(2  $\mu$ L per spot)의 생성물과 아민의 농도에 대한 상관성은 0.1~0.005 mg/mL의 농도 구간에서 가장 높게 나타났다( $R^2 > 0.9906$ ). 또한, 두 가지 프로그램 모두 재현성과 직선성에 대한 유사한 결과를 나타내어 직접적인 유도체화 반응과 TLC 이미지에 대한 이들 프로그램을 사용한 분석이 아민 화합물에 대한 반정량적인 분석으로 사용될 수 있는 가능성을 보였다.

**Key words:** TLC, *in situ* derivatization, repeatability, linearity, image analysis

## 1. 서 론

최근, 전 세계적으로 암페타민과 그 유사체들은 가장 많이 남용되어온 불법 약물 중 하나로 phenethylamine 계열의 화합물들이다.<sup>1</sup> 박층 크로마토그래피(thin-layer chromatography; TLC) 방법은 현장이나 초기 시험(스크리닝) 단계에서 빠르고 간편하게 확인할 수 있는 유용한 방법 중의 하나라고 할 수 있으며,<sup>2-5</sup> 특히 여러 개의 시료들을 동시에 쉽게 비교할 수 있다는 것이 매우 큰 장점이다.<sup>6</sup> TLC 방법은 이처럼 간편하고 경제적인 장점에도 불구하고 HPLC (high performance liquid chromatography)나 GC (gas chromatography)와 비교해서 정확한 정량적 데이터를 제공할 수 없다는 단점 때문에 정성적 분석 이외에는 선호되지 않았다.<sup>7</sup> 그러나 분석기술이 발달함에 따라 현재 TLC 분석방법 역시 더 정교해지면서 정성적 및 정량적인 데이터를 모두 제공할 수 있는 잠재력이 재평가되고 있는 실정이다.<sup>8</sup> 또한 최근에는 ImageDecipher-TLC, Sorbfil TLC Videodensitometer 그리고 JustTLC 등의 기기와 software를 사용하여 정량적 분석이 어려운 단점을 보완해 주고 있다.<sup>9</sup> TLC를 이용한 일반적인 분석 방법은 시료를 적절한 시약으로 전 처리한 후 TLC plate 상에 점적하여 적합한 전개 용매로 전개시켜 결과물을 자연광이나 자외선 하에서 특정 성분의 유무를 확인하는 것이다.<sup>10,11</sup> 그러나 아민 화합물의 분석 시에는 높은 극성으로 인하여 TLC plate 상에서 비선형 효과 및 강한 끌림 현상이 나타날 수 있어 분석에 어려움이 있다. 또한 UV 검출기를 사용할 경우에는 대부분의 파장에서 흡광도가 낮기 때문에 낮은 농도에서 검출이 어렵다.<sup>12,13</sup> 이러한 단점들을 보완하여 신속하고 용이하게 반응 생성물들의 분리와 검출한계(LOD; limit of detection) 농도를 낮추기 위해 크로마토그래피 전/후로 아민을 유도체화 반응시켜 분석 물질의 물리화학적 성질을 적정화하여 사용한다.<sup>14</sup>

유도체화 시약은 그 분자 내 작용기가 암페타민 유

사체의 아미노 그룹과 반응하여 형광발색단을 포함하는 비교적 극성이 낮은 유도체 화합물이 생성되어 크로마토그래피 상에서 선택적인 분리와 검출 민감도를 높여주는 역할을 한다.<sup>15-17</sup> 주로 닐히드린, o-phthalaldehyde(OPA), 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride (Fmoc-Cl), dabsyl chloride (DAB-Cl) 그리고 dansyl chloride (DNS-Cl) 등이 유도체화 시약으로 많이 사용된다.<sup>18,19</sup> 유도체화 시약은 대부분 반응 수득률이 매우 높으며 유도체화 반응 중 생성되는 산성 물질(HCl 등)을 중화시키기 위하여 알칼리성 용액을 사용한다. 또한 반응 생성물의 안정성이 매우 중요하며, 반응 부산물이나 시약 분해 산물이 유도체의 분리에 영향을 미치지 않도록 하여야 하므로 생성된 유도체는 분석 환경에서 비교적 안정적이어야 한다. 이러한 측면에서 Fmoc-Cl은 아민 화합물을 위한 유도체화 시약으로서 아민에 Fmoc group이 결합되어 다소 안정적이고 UV를 강하게 흡수하는 carbamate 형의 유도체를 생성하는 좋은 시약으로 알려져 있다.<sup>20</sup> 또한 Fmoc-NHS는 유도체화 반응 후, UV에 대한 검출한계는 86~300 배의 향상을 보인다고 보고되었다.<sup>21</sup> DNS-Cl의 경우에도 아민과 유도체화 반응으로 극성을 낮추어 TLC 상에서의 분리 능력을 향상시키고 UV 검출도를 높여주는 역할을 한다.<sup>22</sup> 생성된 DNS-amine은 UV 흡수파장대가 ~350 nm 이므로 UV 장파장으로 유도체 화합물을 확인하며, Fmoc-amine은 ~254 nm의 UV 단파장을 이용하여 유도체 화합물을 확인한다.<sup>23</sup>

본 연구에서는 쉽고 간편한 반정량적 분석 방법을 확립하기 위하여 UV light 하에서 검출 능력을 높여주는 3 종류의 유도체화 시약(Fig. 1)과 3 종류의 시료(Fig. 1)를 TLC plate 상에서 co-spot 방식으로 각각 반응 시켰다. 반응 후 유도체화 생성물을 UV light 하에서 육안으로 확인한 다음 각각의 TLC plate를 디지털 카메라로 촬영하여 얻은 이미지를 2 가지의 이미지 분석 프로그램(CP Atlas 2.0 및 ImageJ)으로 분석하여 Microsoft Excel로 재현성(RSD)과 직선성( $R^2$ )이 가장

높게 나타나는 농도 구간을 알아보았다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 시약, 기구 및 실험방법

유도체화 시약(Fig. 1) 3종(9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride; Fmoc-Cl (**I**), N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide; Fmoc-NHS (**II**), 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride; DNS-Cl (**III**))은 각각 Alfa Aesar (USA), Sigma-Aldrich (USA), Acros (USA)사, 그리고 아민류 화합물 (Fig. 1), 3종 (phenethyl amine; PE (**1**), N-methylphenethylamine; NM (**2**), DL-alpha-methylbenzylamine; DL (**3**))은 Sigma-Aldrich (USA)사 제품으로 free base 상태로 구매하여 사용하였다. 전개용매로 사용된 ethyl acetate와 n-hexane는 각각 Daejung (Korea)사와 Alfa Aesar (USA)사에서 구매하였으며 추가적인 정제를 하지 않고 사용하였다. Silica gel TLC plate (20 × 20 cm silica gel 60 F254, Aluminium plate)는 Merck (Germany)사에서 구매하였다. 각각의 시약은 tetrahydrofuran (이하 THF)에 적정 농도로 녹인 후 TLC상에 2 μL (per spot)의 양으로 co-spot 하여 실험하였다. 유도체화 반응 전과 후의 아민 화합물과 유도체화 된 화합물은 UV lamp (254 nm,

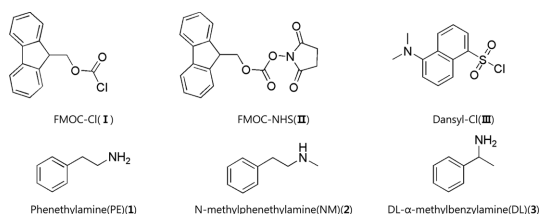


Fig. 1. Structures of derivatization reagents (**I-III**) and amine compounds (**1-3**).

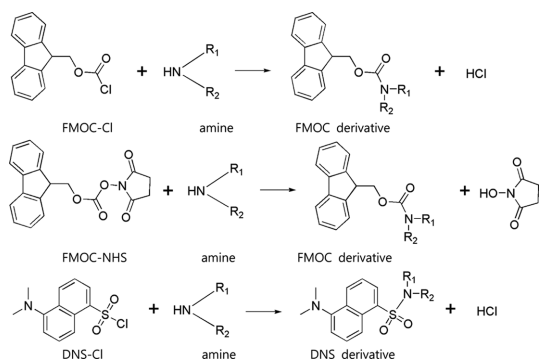


Fig. 2. Reaction of different derivatizing reagents (**I-III**) with amine compounds.

365 nm, Ultra-Violet Product, USA)로 확인하였다.

### 2.2. 유도체화 반응

3종의 아민류 시료 (**1-3**)은 각각 THF 용액에 1.0 mg/mL-0.001 mg/mL 범위의 농도로 희석시켜 2 μL를 TLC plate (10 × 10 cm)에 점적한 후, 즉시 동일 spot 위에 각각 농도 (**I**:4 mg/mL, **II**:5 mg/mL, **III**:3 mg/mL)를 다르게 희석한 3종의 유도체화 시약 2 μL를 점적하여 반응시켰다. 이 같은 실험으로 진행된 3가지의 유도체화 반응식들은 Fig. 2에 요약하였다. DNS-Cl는 반응성 향상을 위하여 반응 spot들을 slide glass로 덮어<sup>24</sup> 10 분간 반응시킨 후 hexane:ethyl acetate =3:1 비율의 용매로 전개하였다. 전개 후 용매를 충분히 건조한 후, 254 nm (Fmoc-group)와 365 nm (DNS-Cl) 파장의 UV 하에서 spot을 각각 확인하였다.

### 2.3. 이미지 분석

유도체화 반응 후 전개를 마친 TLC plate 상 이미지는 NIKON 사의 디지털카메라(NIKON D70s)를 사용하여 촬영하였다. 촬영된 이미지의 분석은 ImageJ (ImageJ 1.49b, NIH, USA <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)와 CP Atlas 2.0 (CP Atlas 2.0, lazarssoftware, USA <http://lazarssoftware.com>) 프로그램을 사용하여 이루어 졌다. ImageJ 분석 시 사용할 TLC 이미지를 gray scale로

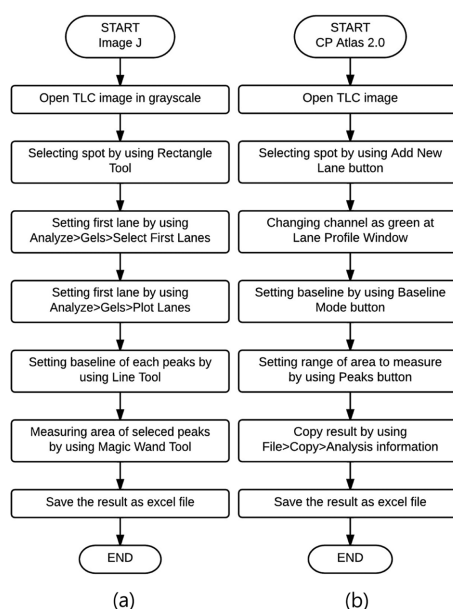


Fig. 3. Flowcharts of TLC image analysis using (a) ImageJ, (b) CP Atlas 2.0.

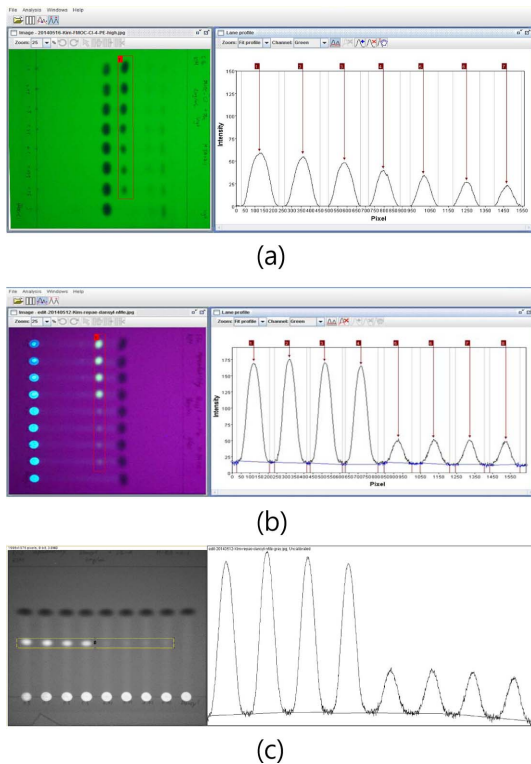


Fig. 4. TLC image analysis using (a) CP Atlas 2.0 (PE derivatized with FMOCl), (b) CP Atlas 2.0 (DL derivatized with DNS-Cl), (c) ImageJ (DL derivatized with DNS-Cl, in grayscale).

변환하기 위해 Adobe photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated, USA)를, 그리고 이미지분석 결과를 검정 곡선(calibration curve)으로 나타내기 위해 Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, USA)를 사용하였다. 촬영한 이미지는 jpg 형식으로 저장하여 TLC를 제외한 배경부분을 Adobe photoshop CS6로 잘라내고 2개의 파일로 복사한 후 하나의 파일은 gray scale로 저장하였다. 각 프로그램을 이용한 이미지 분석의 과정은 Fig. 3과 Fig. 4에 각각 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 유도체화 반응

3종의 유도체화 시약(Fig. 1)에 대한 재현성과 직선성을 평가하기 위한 실험실시험으로 3종의 암페타민 유사 아민 화합물(1-3)과 TLC plate 상에서 직접적인 유도체화 반응을 통해 얻은 실험 결과를 Fig. 5, Fig. 6에 제시하였다.

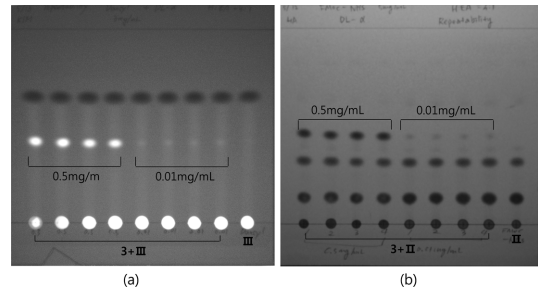


Fig. 5. Photographs of actual silica gel TLCs showing spots to test repeatability of derivatized DL (3) after reaction with derivatizing reagent dansyl chloride (III, (a)) and FMOCl-NHS (II, (b)).

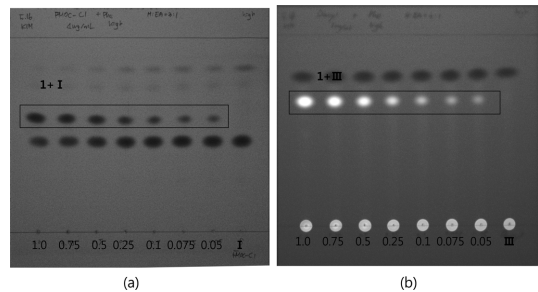


Fig. 6. Photographs of actual silica gel TLCs showing spots to test linearity of derivatized PE (1) after reaction with derivatizing reagent FMOCl (I, (a)) and dansyl chloride (III, (b)).

3 가지 시료 (1-3)를 각각 THF 용액에 1.0 mg/mL-0.001 mg/mL 범위의 농도로 희석시킨 후 TLC plate 상에서 직접 유도체화 반응을 시켜 각각의 설정된 조건에 맞게 처리한 후 전개용매로 전개하여 각각 육안과 254 nm (FMOCl-group) 및 365 nm (DNS-Cl) 파장의 UV 하에서 spot을 확인하였다(Fig. 5, Fig. 6). DNS-Cl로 유도체화 한 경우 TLC 상에서 밝게 보이며(Fig. 5(a), Fig. 6(b)), FMOCl-group으로 유도체화 한 경우 어둡게 spot이 나타난다(Fig. 5(b), Fig. 6(a)). 본 실험에서 각각의 시약은 FMOCl-group의 경우 당량비에 따라 FMOCl (I) (분자량:258.70)은 4 mg/mL, FMOCl-NHS (II) (분자량:337.33)는 5 mg/mL의 농도를 사용했다. DNS-Cl (III) (분자량:269.75)의 경우 분해산물이 장파장의 UV 하에서 형광을 방출하여 생성물의 확인에 어려움을 준다.<sup>24</sup> 따라서 분해산물의 방해가 상대적으로 적은 낮은 농도(3 mg/mL)를 사용하였다. FMOCl-group의 경우 분해산물이 생성된 유도체 화합물에 대한 UV하에서의 확인에 영향이 상대적으로 적어 일정 범위에서는 더 높은 농도의 시약에 의한 유

Table 1. Repeatability; RSD values<sup>a)</sup> of derivatization reactions

Compounds	Derivatization Reagents						
	Cons.	I		II		III	
		A <sup>b)</sup>	B <sup>c)</sup>	A	B	A	B
1	0.01 <sup>d)</sup>	5.27	3.81	2.50	2.72	4.03	4.16
	0.5	1.43	0.69	3.99	2.90	3.43	1.20
2	0.01	4.98	1.94	5.47	3.51	2.44	2.48
	0.5	3.66	1.18	3.30	2.45	3.51	1.23
3	0.01	0.72	3.62	2.44	2.69	3.93	2.82
	0.5	1.06	1.16	2.34	1.76	5.50	3.18

<sup>a)</sup>RSD; relative standard deviation(%)

<sup>b)</sup>analysis by ImageJ

<sup>c)</sup>analysis by CP Atlas 2.0

<sup>d)</sup>range of concentration (mg/mL)

도체화는 더 많은 양의 유도체화 합물을 만들고 검출 한계를 낮추는 결과를 가져오는 것으로 사료된다.

기존의 유도체화 과정은 크로마토그래피 분석 전에 acetonitrile 등의 유기용매 및 완충용액을 혼합하여 실온에서 반응 시킨 후 추출, 여과하는 과정을 거쳐서 분석하므로 다소 복잡하고 시간이 소요되며 시약의 낮은 안정성 및 반응 부산물의 과량생성과 다량의 미반응시약의 존재, 등으로 TLC에 적용하기가 용이하지 않았다.<sup>25</sup> 적용사례로 pre-column 과정에서 유도체화합물을 미리 생성시켜 TLC에 적용하는 경우 미반응된 여분의 FMOCl은 유도체화 과정에서 pentane을 첨가하여 제거할 수 있으며, DNS-Cl의 경우 ammonia를 첨가하여 제거할 수 있다고 보고된 바 있다.<sup>25,26</sup> 또한 DNS-Cl는 부가적인 조건 없이 유도체화 할 경우 검출한계는 0.01-0.005 mg/mL의 범위이나 slide glass를 덮어 반응 용매의 증발을 방지하여 TLC 상에 흡착된 시약과 시료의 반응을 증가시킬 경우에 검출한계는 0.0025-0.005 mg/mL로 향상된다.<sup>24,27</sup> 또는 slide glass를 덮은 후 70 °C oven에서 10 분간 가열 하여 반응성을 향상시킬 수 있을 것으로 예상되므로 추후 실험에서 조건을 추가하여 확인하고자 한다. 또한, 유도체화 반응 중 2 가지 반응에서 산성 물질(HCl)이 생성되므로 반응에 참여하는 아민시료들을 이온화시켜 free base 상태의 시료들을 감소시킬 수 있어 유도체화 반응을 저해하는 요인으로 작용할 것이나 본 실험은 이에 따르는 염기의 처리가 배제된 조건에서 이루어진 결과이다. 따라서 이를 중화시킬 수 있는 염기의 사용, 반응용매 및 반응조건을 찾기 위한 추가적인 실험이 필요하다.

### 3.2. 재현성

실험의 정확도 평가를 위한 방법으로 유도체화 반응에 대한 재현성을 확인하였다. 각 시료별 2 가지의 농도(0.5 mg/mL, 0.01 mg/mL)를 각각 같은 TLC plate 상에 4 번씩 spot하여 실험한 TLC 결과 이미지를 분석하여 얻은 면적 값의 평균을 내어 상대표준편차 (relative standard deviation; RSD (%))값으로 나타내었다. 유도체화 반응에 대한 재현성의 평가는 각 시료별로 0.69-5.50 범위의 RSD 값을 가지는 것으로 나타났다(Table 1). 0.01 mg/mL의 농도에서는 평균 3.31의 RSD 값을, 0.5 mg/mL의 농도에서는 평균 2.44의 RSD값을 나타내어 전체적으로 0.5 mg/mL의 농도에서 상대적으로 더 높은 RSD 값을 보였으며 이는 낮은 농도에서의 background noise가 분석에 영향을 미친 것으로 사료된다. 분석 프로그램 별로 ImageJ의 경우 낮은 농도에서 평균 3.53, 높은 농도에서 평균 3.14로 나타나 CP Atlas 2.0로 분석한 3.08, 1.75 보다 다소 더 높게 나타났다. 이는 프로그램 간의 분석 방법이나 컬러 이미지와 흑백 이미지의 차이, peak 면적을 설정하는 방법 및 background noise가 나타나는 정도 등의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

### 3.3. 직선성

본 연구에서는 유도체화 반응에 대한 상관관계로서 직선성의 평가를 위해 각 시료의 농도별 생성 유도체의 면적값을 검정곡선으로 나타내었고, 결정계수 R<sup>2</sup> 값을 확인하여 Table 2에 나타내었다. 유도체화 된 각 시료의 농도별 면적에 대한 검정곡선을 작성하여 시료의 농도와 유도체 spot 면적 간의 관계를 확인한 결

Table 2. Linearity;  $R^2$  values<sup>a)</sup> of derivatization reactions

Compounds	Conc.	Derivatization Reagents					
		I		II		III	
		A <sup>b)</sup>	B <sup>c)</sup>	A	B	A	B
1	1.0-0.001 <sup>d)</sup>	0.8347	0.8931	0.9068	0.9294	0.9526	0.9376
	0.1-0.005	0.9960	0.9955	0.9945	0.9911	0.9916	0.9938
2	1.0-0.001	0.9152	0.9122	0.9161	0.9240	0.9678	0.9721
	0.1-0.005	0.9916	0.9907	0.9962	0.9955	0.9944	0.9917
3	1.0-0.001	0.9271	0.9358	0.9493	0.9510	0.9928	0.9938
	0.1-0.005	0.9911	0.9966	0.9963	0.9929	0.9906	0.9979

<sup>a)</sup> $R^2$ ; coefficient of determination

<sup>b)</sup>analysis by ImageJ

<sup>c)</sup>analysis by CP Atlas 2.0

<sup>d)</sup>range of concentration (mg/mL)

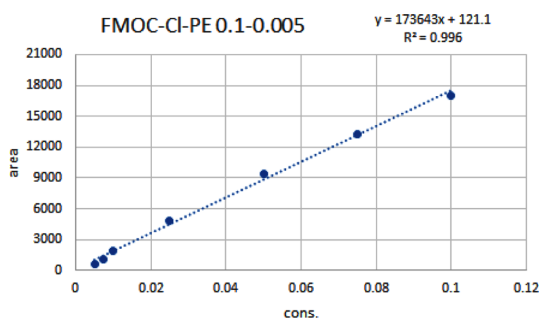


Fig. 7. Calibration curve of derivatized PE (1) (0.1-0.005 mg/mL) with derivatizing reagent FMOCl (I).

과 1차 함수로 표현된 검정곡선에서 가장 높은 결정 계수  $R^2$  값을 확인할 수 있었다. 따라서 직선으로 표현된 검정곡선의 직선성을 평가하면 면적 값으로 주어지는 미지의 농도에 대하여 역으로 추산할 수 있다. FMOCl (I)과 PE (1)의 반응에 대한 검정곡선 그래프와 검정곡선에 대한 데이터를 각각 Fig. 7과 Table 3에 나타내었다. PE (1)의 농도 범위 0.1-0.005 mg/mL에서 검정곡선의 식은 Fig. 7에 나타낸 바와 같이  $y=173643x+121.1$  ( $R^2=0.9960$ )로 나왔으며 y는 피크의 면적 값, x는 시료의 농도이다.

3종의 시료(1-3)와 3종의 유도체화 시약 (I-III)의 반응에서 얻은 이미지를 2가지의 이미지분석 프로그램으로 분석한 결과 각각 1-0.001 mg/mL의 범위에서는  $R^2$  값이 0.8347-0.9938까지의 다양한 값을 나타내었으나 0.1-0.005 mg/mL의 범위에서는  $R^2>0.9906$ 의 높은 직선성을 보였다(Table 2). 시료별 차이는 DNS-Cl의 경우 1-0.001 mg/mL 농도 범위에서 0.9376-0.9938 (평균; 0.9695)의  $R^2$  값이 나타나 FMOCl group의

Table 3. Parameter data for calibration curve of phenethylamine (1) derivatized with FMOCl (I)

Parameter	Value
Linear range	0.1-0.005 <sup>a)</sup>
$R^2$	0.9960
Slope	173643
Intercept	121.1

<sup>a)</sup>mg/mL.

0.8347-0.9493 (평균; 0.9163)보다 다소 더 높게 나타났다. 전체적으로는 0.1-0.005 mg/mL 사이의 직선성이 가장 높게 나오는 구간에서의  $R^2$  값은 평균 0.9938로 1-0.001 mg/mL 농도 범위에서의 평균 0.9339보다 더 높게 나타났다. 시료의 농도와 spot 면적의 상관관계가 높고 그 범위가 넓을수록 정량분석이 가능한 농도 범위가 넓어지며, 미지의 시료 농도에 대한 분석이 더 용이할 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

현장에서 빠르고 간편하게 반정량적인 분석을 할 수 있는 새로운 분석 방법을 모색하기 위해 암페타민류 불법 약물과 구조적으로 유사한 아민을 함유한 화합물과 유도체화 시약을 TLC 상에서 직접 반응시켜 얻은 TLC 이미지 결과에 대한 직선성과 재현성을 평가한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 각 시료별 재현성의 범위가 0.69-5.50 정도로 크지 않았고,<sup>28-30</sup> 직선성이 가장 높게 나타나는 구간(0.1-0.005 mg/mL)에서의 분석 결과가 양호한 편 ( $R^2$

> 0.9906)으로 나타나 차후 연구에서 유효한 자료로 사용 될 것으로 예상된다.

2. Fmoc group의 경우 1-0.001 mg/mL 농도 범위에서 DNS-Cl 보다 다소 더 낮은 R<sup>2</sup> 값이 나타났으나 큰 차이는 없었으므로 세 가지 시약 모두 반정량적 분석을 위한 유도체화에 적합하다고 할 수 있다.

3. 본 실험에서는 TLC plate 상에서 직접 유도체화 방법을 사용하여 각각의 반응하는 화합물의 용량이 크지 않아 유도체화 반응 중에 생성되는 산성 물질을 따로 증화하는 과정을 거치지 않았다. 그러나 소량이라도 반응 중간 생성물을 제거하기 위한 유기염기를 사용한다면 전체적인 LOD가 낮아질 것으로 예상되므로 추후 연구에서 추가적인 실험을 통해 논의되어야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

이 연구는 충남대학교 학술 연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

### References

1. J. M. Płotka, M. Biziuk and C. Morrison, *TrAC Trends in Anal. Chem.*, **30**(7), 1139-1158 (2011).
2. N. Kato, *Science & Justice*, **41**(4), 239-244 (2001).
3. E. Deconinck, P. Y. Sacr, P. Courselle and J. O. De Beer, *J. Chromatogr. Sci.*, **51**, 791-806 (2013).
4. G. Gbitz and R. Wintersteiger, *J. Anal. Toxicol.*, **4**(3), 141-144 (1980).
5. R. A. de Zeeuw, J. Hartstra and J. P. Franke, *J. Chromatogr. A*, **674**(1), 3-13 (1994).
6. R. Kasar, A. Gogia, K. Shah, V. Anand and C. Anand, *RRJPA*, **2**(4), 1-8 (2013).
7. C. Tistaert, B. Dejaegher and Y. Vander Heyden, *Anal. Chim. Acta.*, **690**, 148-161 (2011).
8. S. A. Kustrin and C. G. Hettiarachchi, *Modern Chem. & Application*, **2**(1), e118 (2014).
9. D. Casoni and C. Srbu, *Talanta*, **114**, 117-123 (2013).
10. E. Reich and A. Schibli, In 'High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants', Thieme Medical Publishers, New York, USA (2006).
11. B. L. Ling, W. R. G. Baeyens, B. Del Castillo, K. Stragier, H. Marysael and P. De Moerloose, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 1671-1678 (1989).
12. R. M. Linares, J. H. Ayala, A. M. Afonso and V. Gonzalez, *Analyst.*, **123**, 725-729 (1998).
13. L. A. Barret, A. Polidori, F. Bonnete, P. Bernard-Savary and C. Jungas, *J. Chromatogr. A*, **1281**, 135-141 (2013).
14. P. C. Lindholm, J. S. Knuutinen, H. S. Ahkola and S. H. Herve, *BioResources*, **9**(2), 3688-3732 (2014).
15. P. Leroy, A. Nicolas and A. Moreau, *J. Chromatogr.*, **282**, 561-569 (1983).
16. C. R. Clark and M. M. Wells, *J. Chromatogr. Sci.*, **16**, 332-339 (1978).
17. S. Wawrzycki, E. Pyra and B. Wawrzycki, *J. Planar Chromatogr.*, **14**, 21-23 (2001).
18. S. Hernandez-Cassou and J. Saurina, *J. Chromatogr. B*, **879**(17), 1270-1281 (2011).
19. B. L. Ling, W. R. G. Baeyens, B. Del Castillo, K. Stragier, H. Marysael and P. De Moerloose, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 1671-1678 (1989).
20. G. Maeder, M. Pelletier and W. Haerdi, *J. Chromatogr.*, **593**, 9-14 (1992).
21. S. W. Choi, H. I. Lee and N. D. Sung, *Anal. Sci. & Tech.*, **26**(4), 228-234 (2013).
22. M. B. Gawande and P. S. Branco, *Green Chem.*, **13**(12), 3355-3359 (2011).
23. H. Yamada, A. Yamahara, S. Yasuda, M. Abe, K. Oguri, S. Fukushima and S. Ikeda-Wada, *J. Anal. Toxicol.*, **26**(1), 17-22 (2002).
24. Y. S. Kim and S. W. Choi, *Kor. J. Sci. Crim. Investig.*, **8**(1), 31-36 (2014).
25. R. Kubec and E. Dadkov, *J. Chromatogr. A*, **1216**(41), 6957-6963, (2009).
26. E. De Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. De Maere, M. C. Peeters, G. Derdelinck, H. Paelinck and T. Kowalska, *Food Chem.*, **130**, 1017-1023 (2012).
27. S. W. Choi, S. H. Oh and N. D. Sung, *Korean J. Sci. Crimi. Investig.*, **7**(2), 89-96 (2013).
28. A. V. Irish Hess, *J. Chem. Edu.*, **84**(5), 842-847 (2007).
29. D. S. Maruti and S. K. Banerjee, *J. Res. Pharm. Sci.*, **4**(2), 310-315 (2013).
30. J. Saminathan and T. Vetrichelvan, *KMITL Sci. Tech. J.*, **11**(2), 54-63 (2011).