

TLC/HPTLC에서 측정된 자외/가시부 스펙트럼의 표준화 및 검색

강 종 성

충남대학교 약학대학

(Received April 4, 1994)

Normalization and Search of the UV/VIS Spectra Measured from TLC/HPTLC

Jong Seong Kang

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

Abstract—To improve the identification power of TLC/HPTLC the in situ reflectance spectra obtained directly from plates with commercial scanner are used. The spectrum normalization should be carried out prior to comparing and searching the spectra from library for the identification of compounds. Because the reflectance does not obey the Lambert-Beer's law, there arise some problems in normalization. These problems could be solved to some extent by normalizing the spectra with regression methods. The spectra are manipulated with the regression function of a curve obtained from the correlation plot. When the parabola was used as the manipulating function, the spectra were identified with the accuracy of 97% and this result was better than that of conventionally used the point and area normalization method.

Keywords □ Spectrum Normalization, Spectral Comparison and Search, Correlation Plot, TLC, HPTLC

GC 및 HPLC의 보유시간은 비교적 정확하고 재현성이 좋기 때문에 어떤 물질이나 성분의 정성적 확인에 사용되는 경우가 많으나 TLC/HPTLC의 R_f 치는 사용조건에 따라 변화의 폭이 크고 재현성이 부족하여¹⁾ 표준물질을 나란히 전개시키지 않는 한 정성적인 목적으로는 불충분하다. 근래에 많이 사용되는 TLC scanner로는 주어진 spot에 대한 자외/가시부 spectrum을 직접 측정할 수 있으므로 이 spectrum을 R_f 치와 같이 사용하여 정성적 확인의 유효성을 높일수 있다.

자외/가시부 spectrum을 이용한 물질의 정성적 확인에 관한 연구는 자외/가시부 spectrophotometer를 이용하거나²⁻³⁾ diode array detector를 장착한 HPLC에서⁴⁻⁹⁾ 많이 이루어졌다. 이들의 연구에 사용된 것은 모두가 용액상태의 시료에 대한 흡수 spectrum이어서

TLC상에서 측정된 고체상태의 반사 spectrum에 이들의 이론을 직접 응용하기에는 문제가 있다.

TLC에서 측정된 자외/가시부 spectrum은 자체가 갖는 특징 때문에 효과적인 이용에 있어 다음과 같은 제약을 받는다.¹⁰⁾

— spectrum이 잔류하는 용매의 영향을 받는다.

— 대개의 spectrum은 single beam mode로 측정되어 바탕보정을 필요로 하는데 이것에 대한 확실한 이론이 성립되어 있지 않다.

— TLC에서의 반사 spectrum은 Lambert-Beer의 법칙을 따르지 않는다.

Ebel 등은¹⁰⁾ 반사 spectrum의 표준화에 있어서 바탕보정의 역할에 대하여 발표한 적이 있다. 본 논문은 반사 spectrum이 Lambert-Beer의 법칙을 따르지 않기 때문에 야기되는 문제점과 해결방법에 대하여 보고하고자 한다.

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

실험방법

시약—본 실험에는 전개용매로 toluene과 chloroform(E. Merck, Darmstadt) 1:1 혼액을, 검출시료로 색소혼합물(Farbstoffgemisch, Camag, Muttenz)을 각각 사용하였다. TLC plate로는 HPTLC plate(Kieselgel, E. Merck)를 사용하였다.

기기—시료의 loading에는 LINOMAT(Camag)을, 전개에는 수평전개실(HPTLC LINEAR, Camag)을, spectrum의 측정에는 자체개발된 software와^{11~12)} HP GPIO 98622A가 장착된 HP 9000/300 series computer(Hewlett Packard, Böblingen)로 구동되는 TLC Scanner II(Camag)를 각각 사용하였다.

Test plate—plate에 색소혼합물을 일정량씩 loading하고 전개용매로 전개시켰다. 각 혼합액은 6개의 spot으로 분리되었고, 각각은 R_f 치가 낮은것부터 Ciba F-II, indophenol blue, ariabel red, sudan blue II, sudan IV, aminoazobenzene으로 확인되었다.

Spectrum의 측정—시료의 loading량에 따라 각 spot의 spectrum을 측정하여 Table I과 같이 번호를 부여하였다.

Spectrum의 취급—측정된 spectrum의 등록, 표준화 및 검색은 자체개발한 software로 수행하였다.

비교의 수치화—spectrum의 동일성을 검정하기 위해서는 비교결과를 수치로 표현할 필요가 있다. 비교의 수치화에 있어서는 그 결과를 잘 표현할 수 있고 계산이 간편하며 noise나 과장밀림 등의¹⁰⁾ 오차에 대해서 비교적 덜 민감한 방법을 고려하여야 한다. 본 실험에서는 두 spectrum의 상관도시가 직선에서 벗어나는 정도를 측정한 상대표준편차(relsdev), 직선성의 척도인 상관계수(r)와 두 spectrum의 면적차를 면적합으로 나눈 면적차비(R_{da})의 세 가지 방법에 대하여 연구 검토하였다. 세 가지의 수치는 x_i , y_i 를

두 spectrum 각 파장에서의 signal의 크기로 하여 각각 다음식으로 표현된다.

$$\text{relsdev}(\%) = \frac{\sqrt{S_{dd}}}{\bar{y}} \times 100$$

$$S_{dd} = \sum_{i=1}^n [y_i - (a_1x_i + a_0)]^2$$

a_1 , a_0 는 x_i , y_i 의 직선회귀로부터 구해진 기울기와 y 절편

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

$$R_{da} = \frac{\sum |x_i - y_i|}{\sum x_i + \sum y_i} \times 100$$

결과 및 고찰

Spectrun의 상관도시—두 spectrum의 동일한 파장에서의 signal의 크기를 x, y축에 각각 plot한 것이 상관도시인데, 이것은 두 spectrum이 비슷한 정도의 유용한 척도로 사용될 수 있다. Fig. 1의 (a)와 같이 서로 다른 두 spectrum을 상관도시하면 직선에서 아주 벗어난 형태를 나타내지만, (b)와 같이 loading량이 비슷한 같은 종류의 두 spectrum의 상관도시는 거의 직선을 보인다. 한편 (c)와 같이 동일한 물질이면서 loading량이 상이한 두 spectrum의 상관도시는 직선에서 약간 벗어난 곡선의 형태로 나타나는데 이것은 plate상에서 반사광의 크기가 Lambert-Beer의 법칙을 따르지 않기 때문인 것으로 풀이된다.

Spectrum의 표준화—서로다른 농도에서 측정된 두 spectrum을 비교하기 위해서는 이것을 표준화하여야 한다. 용액상태의 시료로 부터 측정된 spectrum의 표준화에는 점표준화법과 면적표준화법이 일반적으로 사용되고 있다. 점표준화법은 spectrum상의 어느 한 파장에서의 크기를 일정하게 확대 또는 축소하는 방법으로 계산이 간편하지만 noise가 심할경우 spectrum이 왜곡될 가능성이 있다. 이러한 단점을 줄이기 위해서 대부분의 경우 반사광의 극대파장을 이용하거나 근처의 몇파장에 대한 평균값을 이용하기도 한다. 면적표준화법은 spectrum이 갖는 면적을 일정하게 유지시키는 방법으로 spectrum의 전파장에 대한 점표준화와 같은 효과를 같은다. 이러한 표준화법은 용액의 spectrum이나 농도가 서로 비슷한 경우 TLC

Table I—Spectrum numbers of coloring agents

coloring agents	loading amounts as mixture(μl/spot)					
	0.2	0.4	1.0	2.0	5.0	10.0
Ciba F-II	2	20	38	56	77	98
indophenol blue	5	23	41	62	83	104
ariabel red	8	26	44	65	86	107
sudan blue II	11	29	47	68	98	110
sudan IV	14	32	50	71	92	113
aminoazobenzene	17	35	53	74	95	116

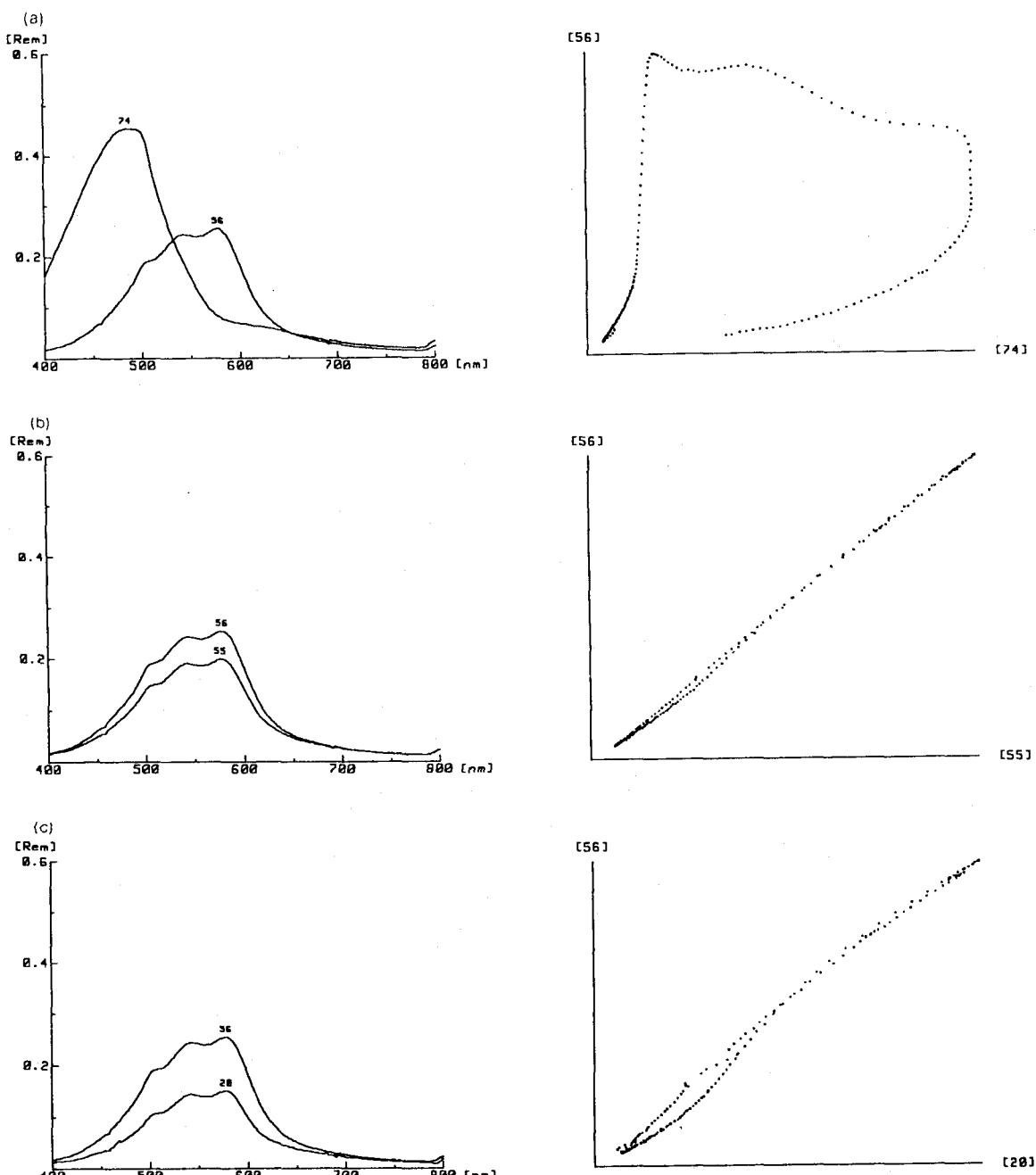


Fig. 1—Spectra and their correlation plot.

(a) Ciba F-II: aminoazobenzene (b) Ciba F-II 5 : 4 (c) Ciba F-II 5 : 1

상의 spectrum에 문제없이 적용될 수 있다.

농도차가 큰 경우 TLC상의 spectrum의 표준화에 있어서 이러한 표준화법은 적용상의 어려움이 있었

으므로 상관도시로 부터 구한 회귀식을 이용한 표준화를 시도하였다. Fig. 2에서 본 바와 같이 농도차이가 큰 경우의 상관도시는 꼭선의 형태를 보이므로 회귀

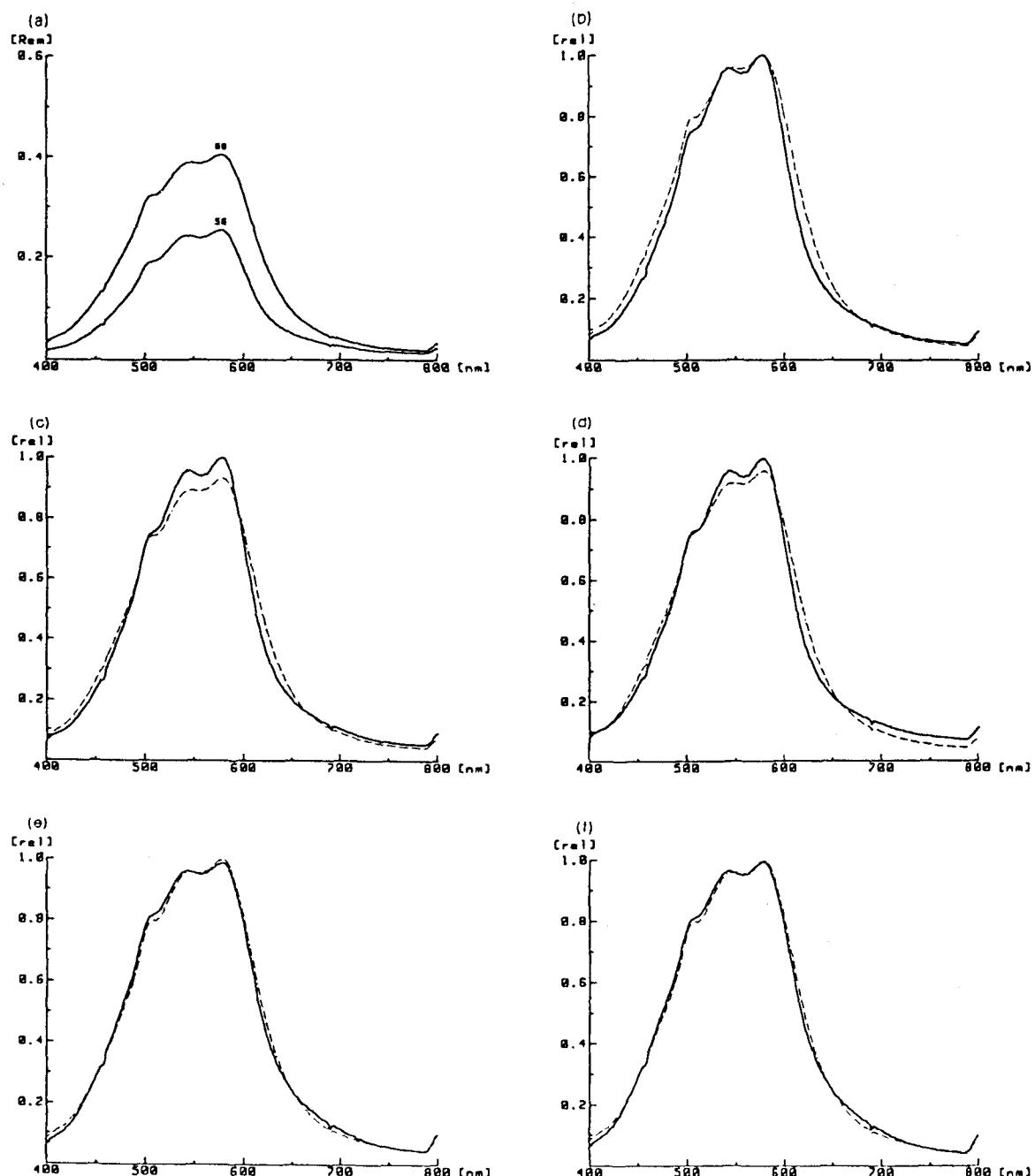


Fig. 2—Original and normalized spectra.

(a) unnormalized (b) point normalization (c) area normalization (d) linear regression (e) parabola regression (f) Michaelis-Menten eq.

방법에 의하여 곡선의식을 찾아내어 이식을 이용하여 비교하고자 하는 spectrum을 재구성하고 서로

비교하였다. 회귀식으로는 직선, 이차곡선과 Michaelis-Menten식을 사용하였다.

$$\hat{y}(a) = a_0 + a_1 x \quad (\text{직선})$$

$$\hat{y}(x) = a_0 + a_1 x + a_2 x^2 \quad (\textcircled{1} \text{차곡선})$$

$$\hat{y}(x) = a_0 = a_0 + \frac{a_1 x}{a_2 + x} \quad (\text{Michaelis-Menten 식})$$

x, \hat{y} : 비교 spectrum과 재구성된 spectrum의 각 파장에서의 signal크기

Fig. 2는 표준화하기 전의 두 spectrum과 다섯가지 서로다른 방법으로 표준화된 spectrum을 나타낸 것이다. 두 물질은 동일물질이며 loading량은 5 : 1이다. 점표준화, 면적표준화 및 직선회귀에 의해 표준화된 spectrum(b,c,d)에서는 loading량이 큰 spectrum의 봉우리 부분이 상대적으로 낮으며 비교되는 두 spectrum의 차이가 크게 나타나고 있다. 이러한 경우에는 두 spectrum이 서로 다른 것처럼 오인되기 쉽다. 곡선회귀에 의해 표준화된 spectrum(e,f)은 그 모양이 상당히 일치함을 볼 수 있다.

다섯가지 방법으로 표준화된 spectrum을 비교하고 그 결과를 수치로 보인것이 Table II이다. 이것으로 볼 때 이차곡선이나 Michaelis-Menten식을 이용한 곡선회귀에 의한 표준화방법이 동일한 spectrum을 인식하는데 유리함을 알 수 있다.

Table II—Numerical expression of comparison of the spectra normalized by various methods

normalization method	numerical expression		
	reldsv	R _{da}	r
point normalization	8.803	4.099	0.9946
area normalization	8.806	3.883	0.9946
linear reg.	8.802	3.702	0.9946
parabola reg.	3.972	1.615	0.9989
Michaelis-Menten eq.	3.876	1.594	0.9990

Spectrum 검색—각 물질중 가장 많은 량을 loading하였을 때의 spectrum을 standard spectrum으로 하여 library에, 그 나머지를 모두 비교 spectrum으로 등록시키고 비교 검색한 결과를 Table III에 나타내었다. spectrum은 시간이 짧게 소요되는 이차곡선 회귀법을 사용하였고 비교결과는 R_{da}가 10% 미만인 경우는 동일한 spectrum으로 간주하여 “+”로, 그 이상인 경우는 상이한 spectrum으로 간주하여, “-”로 표기하였다. loading량의 차이가 클 경우에 오차가 많았으며 특히 aminoazobenzene의 경우는

Table III—Searched results of coloring matters from a library

sp # ^{b)}	spectrum numbers ^{a)}					
	98	104	107	110	113	116
20	+	-	-	-	-	-
38	+	-	-	-	-	-
56	+	-	-	-	-	-
77	+	-	-	-	-	-
23	-	+	-	-	-	-
41	-	+	-	-	-	-
62	-	+	-	-	-	-
83	-	+	-	-	-	-
26	-	-	+	-	-	-
44	-	-	+	-	-	-
65	-	-	+	-	-	-
86	-	-	+	-	-	-
29	-	-	-	+	-	-
47	-	-	-	+	-	-
68	-	-	-	+	-	-
89	-	-	-	+	-	-
32	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	+	-
71	-	-	-	-	+	-
92	-	-	+	-	+	-
35	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	+
95	-	-	-	-	-	+

a) In the library registered spectra(standard spectra)

b) Spectra to be compared

과장밀립이 심했다. 이러한 오차는 미분 spectrum이나 과장밀립 보정 등¹⁰⁾의 방법으로 줄일 수 있었다.

등록된 모든 spectrum을 다섯가지 방법으로 각각 표준화하여 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Michaelis-Menten식으로 표준화한 경우 정확도가 약 97%로 이차곡선의 경우와 비교하여 결과는 비슷하였으나 표준화 및 검색에 소요되는 시간이 10배 정도 길었다. 일반적으로 사용되고 있는 점표준화법 및 면적표준화법은 90%에도 미치지 못하는 정확도를 보였다. 이상의 사실을 종합할 때 TLC/HPLC에서 측정된 자외/가시부 spectrum의 표준화에는 이차곡선회귀법이 유용할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제

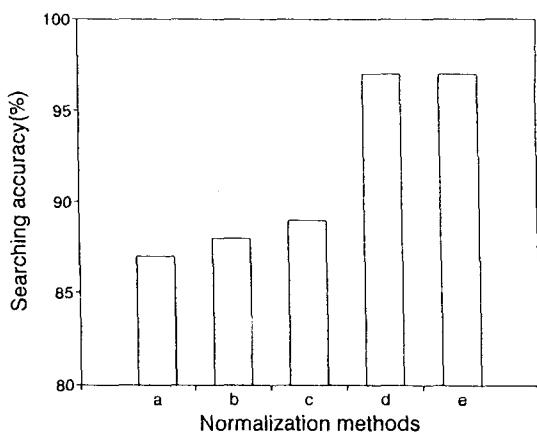


Fig. 3—Searching accuracy of spectra from a library at various normalization methods.

(a) point normalization (b) area normalization
 (c) linear regression (d) parabola regression (e)
 Michaelis-Menten eq.

연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Geiss, F.: Fundamentals of thin layer chromatography(planar chromatography). Dr. Alfred Huthig Verlag, Heidelberg, p. 3, (1987).
- 2) Lee, S. Y., Ro, I. H., Park, M. K., Park, J. H., Cho, J. H.: Development of identification system of derivative spectra of pharmaceuticals by fast Hartley transform. *Yakhak Hoeji*, **35**, 17-22 (1991).
- 3) Brown, C. W., Donahue, S. M.: Searching a UV-visible spectral library. *Appl. Spectroscopy*, **42**, 347-352 (1988).
- 4) Fell, A. F., Clark, B. J., Scott, H. P.: Computer-aided strategies for archive retrieval and sensitivity

enhancement in the identification of drugs by photodiode array detection in high-performance liquid chromatography.: *J. Chromatogr.*, **316**, 423-440 (1984).

- 5) Alfredson, T., Sheehan, T., Lenert, T., Aamodt, S., Correia, S.: Determination of compound identity by group type and class using diode-array detection in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **385**, 213-223 (1987).
- 6) Huber, L., Drouen, A.: UV/VIS Spektrenbibliotheken-eine wertvolle Hilfe bei Identifizierung unbekannter Substanz in der HPLC- *Gift Fachz. Lab.*, 16-19 (1988).
- 7) Vandeginste, B. G. M., Kateman, G., Strasters, J. K., Billiet, H. A. H., de Galan, L.: Data handling in HPLC-diode array UV-spectrometry. *Chromatography*, **24**, 127-134 (1987).
- 8) Miller, J. C., George, S. A., Willis, B. G.: Multichannel detection in high-performance liquid chromatography. *Science*, **218**, 241-246 (1982).
- 9) Zech, K., Huber, R., Elgass, H.: On-line screening for drug metabolites by high-performance liquid chromatography with a diode array UV detector. *J. Chromatogr.*, **282**, 161-167 (1983).
- 10) Ebel, S., Kang, J. S.: UV/VIS spectra and spectral libraries in TLC/HPTLC 1. Background correction and normalization. *J. Planar Chromatogr.*, **3**, 42-46 (1990).
- 11) Wuthe, W.: Rechnergesteuerte Auswertung in der Dünnenschichtchromatographie mit Photodiodenarray Scanner. Ph.D. Dissertation, Würzburg (1986).
- 12) Allwohn, J.: Rechnergesteuerte Auswertung von Elektropherogrammen anhand der Aminoglykositantibiotika. Ph.D. Dissertation, Würzburg (1988).