

高速 液體 크로마토그래피에 의한

cis- 및 *trans*-Neopynamin과 Fenitrothion의 分離 定量에 관한 研究

李 王 圭·丁 海 秀

서울대학교 약학대학

(Received April 16, 1980)

Wang Kyu Lee and Hae Soo Chung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Studies on the Differential Determination of *cis*-, and *trans*-Neopynamin and Fenitrothion by High Pressure Liquid Chromatography

Abstract—A new application of high pressure liquid chromatography for the determination of fenitrothion and *cis*- and *trans*-neopynamin in insecticidal preparations was investigated. Optimum conditions for a good separation and determination were determined; solvent system: dichloromethane+n-hexane=17:83; flow rate: 0.5 ml/min; column: u-porasil (4mm×30cm); absorbance wavelength: 254nm; 0.05 AUFS and sample size: 30 ul. Recovery of fenitrothion, *cis*- and *trans*-neopynamin from mixed artificial preparations was 99.6%, 99.7% and 99.8% respectively. Also reproducibility tests showed that the coefficient of variation was 0.89% for fenitrothion, 0.74% *cis*-neopynamin and 1.1% for *trans*-neopynamin. There was no interference with insecticidal preparation containing DDVP, allethrin, S-421 and kerosene. HPLC method was rapid, accurate and it gave better reproducibility and higher sensitivity than any other analytical method. It was considered that HPLC could be greatly applied to the analysis of fenitrothion and neopynamin in insecticidal preparations.

pyrethroid系化合物中 合成物質인 neopynamin은 殺虫劑 主成分으로 널리 使用되고 있다. 이 물질에는 *cis*型, *trans*型의 2個의 異性體가 存在하며 *trans*型이 *cis*型보다 殺虫效果가 더 優秀하다.

有機燐化合物中에는 殘留 毒性이 적은 fenitrothion 및 DDVP 등이 neopynamin과 配合되어 使用되고 있다. 殺虫劑 主成分인 neopynamin 및 fenitrothion의 分析法으로는 滴定法⁵⁾, 吸光度法⁵⁻⁷⁾, 및 gas chromatography法⁹⁻¹³⁾ 등이 있다.

그러나 滴定法 및 吸光度法은 모두가 前處理가 複雜하여 長時間을 要하며 異性體의 分離定量은 不可能한 短點이 있다. 최근에 發表된 gas chromatography法은 다른 分析法 보다는 優秀하나 再現性이 좋지 않고 製劑中에서 neopynamin의 異性體 分離를 할수 없는 短點이 있다.

또한 high pressure liquid chromatography (=HPLC)를 利用하여 *cis*-, *trans*-neopynamin 및 fenitrothion을 分離定量한 分析法은 아직 報告된 바 없다. 著者들은 이에 着眼하여 HPLC를 利用하여 *cis*- 및 *trans*-neopynamin과 fenitrothion의 同時 分離 定量法을 檢討하였던 바 良好한 結果를 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

實驗 方法

試藥 및 試料—dichloromethane 및 n-hexane은 日本 和光純藥의 LC用을 使用하였으며 標準

品은 fenitrothion 및 neopynamin (*trans/cis*=83/17) 日本 住友化學의 標準品을 使用하였다. 또한 製劑로서는 日本 標準品 및 市販品을 그대로 使用하였다.

器機—high pressure liquid chromatograph 와 recorder 는 각각 Waters Model 244 型과 Texas Instruments 2 pen system 을 使用하였다.

標準 操作—neopynamin(標準品) 및 fenitrothion(標準品) 一定量을 精取하여 n-hexane 에 溶解시켜 각각 300 mcg/ml 및 6 mcg/ml 가 되도록 調製하고 millipore filter (0.22 μ m)를 使用하여 여과한 液을 標準溶液으로 하고 市販 殺虫劑로부터 液化개스를 水浴上에서 완전히 留去시킨 後 一定量을 精取하여 n-hexane 에 溶解시켜 標準溶液과 同一한 濃도가 되도록한 것을 試料溶液으로 使用하였다. 標準 溶液과 試料 溶液을 각각 30 μ l씩을 注入한 다음 Table I 과 같은 조건에서 HPLC 를 行한다. 각 標準溶液의 Chromatogram 으로부터 얻은 *cis*- 및 *trans*-neopynamin 과 fenitrothion 의 peak 높이로부터 檢量線을 作成하여 試料 溶液의 Chromatogram ' peak 높이를 檢量線에 代入하여 *cis*- 및 *trans*-neopynamin 과 fenitrothion 의 量을 算하였다.

Table I—Conditions of high pressure liquid chromatography.

Column: u-porasil (4 mm \times 30 cm)
Detector: UV254 absorbance detector
Mobile phase: dichloromethane/n-hexane=17/83
Flow rate: 0.5 ml/min
Column temp: ambient
Sample size: 30 μ l
Chart speed: 6 inch/hr
Sensitivity: 0.5 AUFS

結果 및 考察

測定 條件의 檢討—1) 吸收波長의 選擇: neopynamin 의 吸收極大波長이 282 nm¹⁸⁾ (溶媒 클로로포름 使用)으로 報告되어 있으나 上記 條件의 移動相에서는 response 의 差異가 거의 없고 fenitrothion 은 280 nm 에서 보다 254 nm 에서 높은 response 를 나타내었으므로 이 實驗에서는 UV 254 nm 를 擇하였다.

2) 移動相의 選擇: 數種의 溶媒를 單獨 또는 混合液으로 하여 分離의 樣狀을 관찰하였으나 分離는 모두 만족스럽지 못하였다. 그러나 그 중에서 가장 分離가 良好하게 나타난 溶媒가 dichloromethan 및 n-hexane 의 混合液이었다. 이 混合液의 比率에 따른 retention time 및 吸光度에 미치는 影響을 檢討한 結果 Fig. 1 에 圖示한 바와 같다. dichloromethane 에 대하여 n-hexane 의 比率을 90%에서 80%까지 變化시켰을 때 retention time 의 比率이 增加함에 따라서 增加하였으며 이와 반대로 n-hexane 의 比率이 減少함에 따라서 吸光度는 增加하였다. 또한 이때 分離에 미치는 影響은 dichloromethane 및 n-hexane 의 比率이 20:80에서는 異性體 分離가 되지 않았으며 17:83에서 부터는 異性體가 分離되었다. dichloromethane 의 比率이 15:85 以下에서는 分離는 完全하였으나 吸光度가 너무 낮았다. 그러므로 이 實驗에서는 dichloromethane: n-hexane 의 比率이 17:83인 것을 移動相으로 擇하였다.

3) 流速의 影響: 流速을 1 ml/min 에서 0.4 ml/min 까지 變化시켰을 때 *cis* 및 *trans*-neopynamin 과 fenitrothion 의 分離는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 流速이 減少함에 따라 分離는 良

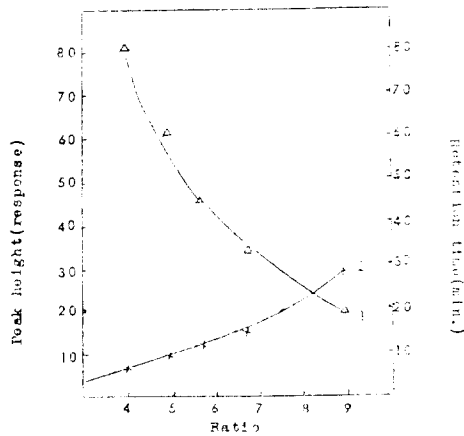


Fig. 1—Effect of ratio of n-hexane to dichloromethane on peak height and retention time of trans-neopynamin. Key-1: Peak height curve. 2: Retention time curve

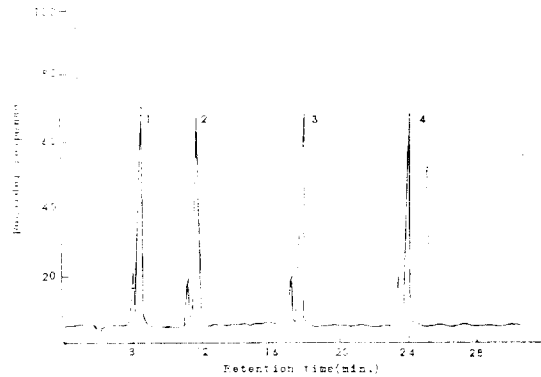


Fig. 2—Effect of various flow rates on the separation and retention time of neopynamin. Key-1: 1.0 ml/min; 2: 0.7 ml/min; 3: 0.5 ml/min; 4: 0.4 ml/min.

好하였다. 특히 流速 0.5 ml/min 以下에서는 neopynamin의 두 이성체가 完全히 分離되었다. 또한 retention time은 流速 0.7 ml/min 以上부터는 급격히 增加하였다. 그러므로 이 實驗에서는 retention time이 빠르고 cis- 및 trans-neopynamin의 分離가 良好한 流速의 條件으로는 0.5 ml/min을 擇하였다.

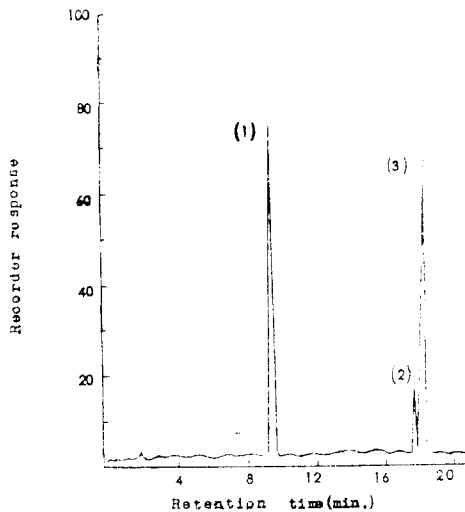


Fig. 3—Liquid chromatogram of a standard mixture. Key-1: fenitrothion(6mcg/ml); 2: trans-neopynamin (250 mcg6ml).

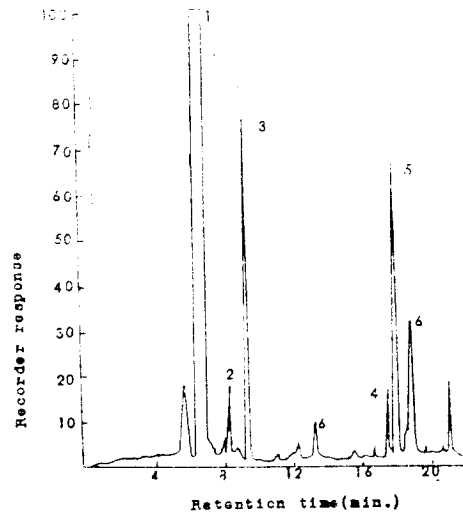


Fig. 4—Liquid chromatogram showing the separation of standard mixture. Key-1: Kerosene; 2: S-421; 3: Fenitrothion; 4: cis-Neopynamin; 5: trans-Neopynamin; 6: Allethrin.

以上の實驗 結果로부터 얻은 最適條件에서 標準液 30 μ l 을 注入하였을 때 Fig. 3 과 같은 Chromatogram 을 얻었다. 이에 나타난 바와같이 fenitrothion, *cis*-neopynamin 및 *trans*-neopynamin 의 retention time 은 각각 9分, 18分 및 19分에서 良好하게 分離되었다.

4) 檢量線 : 標準溶液을 다음과 같이 稀釋하여 最適條件에서 標準操作에 따라 實驗하였으며 fenitrothion 2~8 r/ml, *cis*-neopynamin 및 *trans*-neopynamin 은 50~300 r/ml 로 變化시킨 溶液을 使用하여 實驗한 結果 濃도와 peak 의 높이간에 Beer 의 法則이 成立되어 良好한 直線性을 나타내었다.

5) 共存 物質에 대한 影響 : 一般殺虫劑에서 使用되는 原料와 効力增強劑, 溶劑에 대한 影響을 각 物質마는 檢討한 結果 Table II 와 같이 全然 影響을 받지 않았으며 또한 이들 物質을 가지고 標準 處方(Table III)에 따라 調製하여 實驗한 結果 Fig. 4 와 같은 chromatogram 을 얻었다.

Table II—Effect of other materials on the determination of fenitrothion and neopynamin

Other material	mg/ml	Recovery (%)	
		Fenitrothion 6r/ml	Neopynamin 300r/ml
DDVP	100	99.8	99.5
Allethrin	0.2	100.1	99.8
Piperonyl Butoxide	0.2	100.8	10.1
S-421	4	100.3	99.8
Kerosene	10	100.1	99.5

6) 再現性 : 再現性에 있어서도 Table IV 에 나타난 바와 같이 變異係數는 fenitrothion 이 0.89 %, *cis*-neopynamin 0.74% 및 *trans*-neopynamin 1.13%였다. 市販 製品에 대하여 HPLC 方法을 適用할 時에도 다른 方法에 비해 再現性이 良好하였다.

Table III—Standard formulation for analysis

Component	Declared, g (%)
Neopynamin	0.30 (0.3)
Fenitrothion	0.006(0.006)
S-421	4.0 (4.0)
DDVP	1.0 (1.0)
Allethrin	0.2 (0.2)
Perfume	q. s
Kerosene sufficient to make 100.0ml	

7) 應用 : 市販 製劑 6種을 製造 日字가 最近으로 된 것을 取하여 標準 操作法에 準하여 分析한 結果는 Table V 와 같았다. 이때 共存物質의 影響을 받지 않고 前處理操作 없이 신속하게 定量할 수 있었다.

Table IV—Comparison of HPLC and other methods for fenitrothion and neopynamin in a commercial preparation.

No. of tests	Recovery (%)			
	Fenitrothion		Neopynamin	
	HPLC	VIS	HPLC	TLC
1	101.1	94.5	98.9	108.0
2	102.5	66.0	99.5	103.0
3	100.1	98.9	100.3	97.5
4	99.5	95.6	97.5	96.5
5	98.7	93.2	101.5	105.9
6	—	—	100.8	101.0
Average	100.38	95.64	99.75	102.0
S. D.	1.47	2.12	1.44	4.81
C. V. (%)	1.47	2.20	1.44	4.72

Table V—Analytical results of fenitrothion and neopynamin in commercial preparations by HPLC.

Simple	Declared, mg/ml		Recovery, % ¹⁾	
	Fenitrothion	Neopynamin	Fenitrothion	Neopynamin
A	16.7	3.7	103.0	101.5
B	16.7	3.7	95.7	98.0
C	12.5	5.0	100.1	98.9
D	—	3.3	—	68.0
E	—	3.5	—	96.7
F	—	3.3	—	101.2

1) Each result is the average of three determinations.

結 論

이 定量法은 neopynamin 의 cis 型 및 trans 型과 fenitrothion 이 함유된 殺虫劑를 複雜한 前處理過程을 밟지 않고 n-hexane 으로 稀釋하여 一定한 濃度로 만든다음 HPLC 를 利用하여 定量할 수 있는 方法이다.

그 뿐만 아니라 感度도 銳敏하여 fenitrothion 3.6×10^{-6} M 및 neopynamin 1.5×10^{-4} M 의 濃度에서도 同時 定量이 可能하였으며 定量 範圍는 각각 $3.6 \times 10^{-6} \sim 2.9 \times 10^{-5}$ M 및 $1.5 \times 10^{-4} \sim 1.2 \times 10^{-3}$ M 이었다. 특히 cis 型, trans 型의 異性體를 가진 neopynamin 을 製劑中에서 共存 物質의 影響을 받지 않고 完全히 分離定量을 할 수 있었다. HPLC 法은 다른 分析法에 비하여 操作이 簡便할 뿐만 아니라 再現性도 매우 良好하여 迅速 正確하게 同時 定量할 수 있는 長點이 있었으므로 製劑의 應用에도 많이 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

文 獻

1. T. Kato, K. Ueda and K. Fujimoto, *Apr. Biol. Chem.*, **28**, 914(1964).
2. Sharder, *Angew. Chem.*, **73**, 331(1961).
3. Staudinger and Harder, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, **429**, I (1929).
4. 武居三吉, 若園潔, 大野稔, *農化*, **16**, 389(1940); **18**, 766(1942).
5. 厚生省 製藥編: 殺融劑指針
6. N. Oi and I. Umeda, *Japan Analyst*, **15**, 285(1966).
7. J. Miyamoto, in *Analytical Methods for Pesticides*, ed. by G. Zweig, Vol. VII, p.345, Academic press, New York, 1973.
8. N. Oi and I. Umeda, *Japan Analyst*, **15**, 281(1966).
9. H. Murayama, K. Kyogoku and T. Iguchi, *Nippon Negeikagaku Kaishi*, **42**, 676(1968).
10. N. Baba, A. Nagayasu and M. Ohono, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 343(1970).
11. A. Murano, S. Fujiwara and T. Kosaka, *Japan Analyst*, **21**, 890(1972).
12. Anonymous, *Neopynamin*, Technical Manual of Sumitochemical Company, Higashi-ku, Osaka, Japan 1972.
13. 河合聰, *Japan Analyst*, **14**, 360(1965).
14. A. Murano and M. Horiba, *Japan Analyst*, **20**, 789(1971).
15. M. Horiba, H. Kitahara and A. Murano, *Japan Analyst*, **22**, 595(1973).
16. J. F. Thompson, A. C. Walker and R. F. Moseman, *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **52**, 1263(1969).
17. A. Aner calstrom, *JAOAC*, **60**, 1157(1973).
18. 月刊 藥事 **12**, 1242(1970).