

GC-OTC/FID에서 Dead Time 결정을 위한 새로운 방법 개발에 대한 연구

오도석 · 김성화* · 고은아 · 전형우†

대한산업보건평가원

†(주)바이오앱

(접수 2018. 12. 6; 2019. 5. 18)

A Study on the New Development for Determination of Dead Time in GC-OTC/FID

Doe Seok Oh, Sung Wha Kim*, Eun Ah Ko, and Hyung Woo Jeon†

Institute of Korea Industrial Health and Evaluation, Hwaseong 18401, Korea. *E-mail: marskim9600@gmail.com

†Bioapp, Inc

(Received December 6, 2018; Accepted May 18, 2019)

요 약. GC-OTC/FID(Gas chromatography-Open Tubular Column/Flame Ionization Detector) 계에서 극성 용매(Alcohols)를 분리 하기 위하여 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 사용하였다. 이 계에서는 극성 용매들 보다 DMSO가 늦게 용출이 된다. 이런 계에서 크로마토그래픽 인자인 조정된 머무름 시간($t_r' = t_r - t_0$)과 용량 인자 $\{k' = (t_r - t_0)/t_0\}$ 및 분리 인자 $\{\alpha = (t_{r2} - t_0)/(t_{r1} - t_0)\}$ 를 구하기 위하여 불감시간(t_0)이 필요하다. 그러나 이런 계에서 t_0 를 구하기 위한 보고가 현재까지 된 바가 없기 때문에, 본 연구에서는 t_0 를 구하는 방법을 개발하고자 하였다. t_0 를 계산하기 위하여 DMSO의 머무름 시간(DMSO t_r)을 상용로그로 전환하였다($f(x) = \log t_{r(DMSO)} \rightarrow t_0$, $t_0 = \log 9.551 = 0.980$). 개발된 방법의 적합 여부를 확인하기 위하여 CH_4 의 t_r 과 $\ln t_{r(DMSO)}$ 를 $\log t_{r(DMSO)}$ 와 비교하였다. 세 가지 방법 중 CH_4 t_r 과 $\ln t_{r(DMSO)}$ 는 k' 과 α 를 계산하는데 적합하지 않았다. 본 연구에서 개발한 방법인 $\log t_{r(DMSO)}$ 는 일반적인 기준인 $k'(1 < k' < 10)$ 과 $\alpha(1 < \alpha < 2)$ 를 만족하였다. 본 연구에서 개발한 계산방법은 쉽고 편리하기 때문에, 이와 유사한 계에서도 활용될 것으로 기대된다.

주제어: 크로마토그래픽 인자, 불감시간(t_0), DMSO, 로그

ABSTRACT. In the system of GC-OTC/FID (Gas chromatography-Open Tubular Column/Flame Ionization Detector), DMSO (Dimethyl sulfide) solvent was used to separate the polar solvents (Alcohols). In this system DMSO was eluted later than the separated polar solvents. At this system to calculate chromatographic factors [adjusted retention time ($t_r' = t_r - t_0$), capacity factor $\{k' = (t_r - t_0)/t_0\}$ and separation factor $\{\alpha = (t_{r2} - t_0)/(t_{r1} - t_0)\}$], dead time(t_0) is necessary, but the method to calculate it has not been reported yet. Therefore, we have tried to develop t_0 . To calculate t_0 , we conversed DMSO retention time (DMSO t_r) to logarithm ($f(x) = \log t_{r(DMSO)} \rightarrow t_0$, $t_0 = \log 9.551 = 0.980$). To confirm the optimization of the developed method, we compared with CH_4 t_r and $\ln t_{r(DMSO)}$. Both of the values calculated by CH_4 t_r and $\ln t_{r(DMSO)}$ were not suitable in the calculation k' and α . The developed method in this study $\{\log t_{r(DMSO)}\}$ has satisfied both of the values k' criteria ($1 < k' < 10$) and α ($1 < \alpha < 2$). The developed calculation method in this study was easy and convenient, therefore it can be expected to be applied to these similar systems.

Key words: Chromatographic factors, Dead time (t_0), DMSO, Logarithm

서 론

Chromatography는 20세기 초 Michael Tswett에 의해 최초로 사용된 이래 현재까지도 눈부신 발전을 계속하고 있는 분리 분석 분야이다. 여기에 사용되는 가장 기본적인 인자는 머무름 시간(t_r)이다. t_r 은 시료 주입 시점으로부터 봉우리의 꼭지점까지의 시간으로 용질들의 t_r 을 이용하여 성분들을 정성할 수 있다. 그러나 동일한 GC의 조건과 컬럼에서도 다른 분석 환경(man, time, lab and place etc.)의 변화에 의

해 약간씩 t_r 이 변하므로 다른 분석 환경에서의 t_r 만을 비교하여 동일 물질의 확인 및 정성을 하는 데는 무리가 있다. 이런 이유로 크로마토그래픽 분리와 이론적인 모델 공식의 합당화(Optimization)를 위하여 다른 머무름 척도인 조정된 머무름 시간(t_r')과 머무름 비(k' ; 용량 인자)가 머무름 시간(t_r)보다 중요하다. k' 은 운반 기체의 부피 속도나 선형 속도의 변화에 대한 요인을 없애기 위해 사용된다. k' 은 용질이 정지상에 머무르는 시간에 대한 이동상에서 머무르는 시간의 상대적인 양으로 단위가 없고 컬럼 간에 직접적

비교가 가능해 유용하다.

t_R 과 k' 은 $t_R = t_R - t_0$, $k' = (t_R - t_0)/t_0$ 에 의해 계산된다. 불감시간(t_0 ; dead time, void time, hold-up time)은 모든 용질들이 이동상에서 보내는 시간으로, 정지상에서 머무름이 없는 성분을 주입함으로써 구할 수 있다. 그러나 t_0 의 참값은 어떤 조건하에서도 측정하기가 어려우며, 측정을 위한 원칙이 없고 크게 실험에 의존한다. 그러므로 t_0 의 정확한 결정은 아직도 논쟁¹⁻³이 되는 사안이다. GC에서 t_0 결정을 위한 물질의 선택은 사용되는 특별한 실험 조건이나 사용된 검출기(TCD/FID/ECD/TID/FPD/MSD/ELCD etc.)에 의존한다. 따라서 t_0 의 정확한 측정 없이 분리 시스템에 관련된 Chromatographic factors (t_R , k , α etc.)를 정확하게 계산할 수 없으므로 참값에 근접할 수 있는 t_0 결정 방법이 절실히 요구된다. 따라서 일차적으로 t_R , k' 및 분리 인자($\alpha = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0)$)를 계산하려면 t_0 를 정확하게 측정할 필요성이 있다.⁴ t_0 를 결정하기 위한 많은 방법들^{5,6}이 제안되었으며, 이들 방법들은 크게 다음과 같이 네 가지로 분류된다.⁷

i) 머무르지 않는 용질의 머무름 시간 측정
ii) 동족계열 물질의 머무름에 기초한 Regression calculation로부터의 추론

iii) 고온에서 용매 피크의 선단으로부터

iv) 이동상의 Poiseuille's law behavior로부터 계산

불감시간을 측정하는 방법 중 간접적인 방법은 여러 동족 계열(Homologous series)의 화합물들을 분석하여 회귀적 계산(Regression calculation)을 하는 방법⁸이나 복잡한 수학적 계산⁹을 하여야만 하는 불편함이 있다. 따라서 직접적인 방법이 자주 사용되어 왔으나 직접적인 방법도 분석 조건(이동상 흐름 속도, 컬럼 온도, Unretained makers)에 따라 변하므로 신중을 기하여야 한다. GC에서는 편의성을 위하여 분석 물질과 동시에 검출기의 종류에 따라 Marker가 되는 물질을 같이 미량 주사하여 얻어지는 머무름 시간을 불감시간으로 활용하였고, 분석 물질 앞에 용리되는 용매 피크¹⁰를 사용기도 하였다. 한편 HPLC에서는 편리한 방법으로 이동상 자체에서 나타나는 Ghost peak의 머무름 시간을 자주 활용하였으며, NPC에서는 Benzene, RPC에서 Uracil 등을 사용하여 불감시간을 결정하였다.^{11,12} 만약 t_0 의 위치가 의문스러우면 다른 머무르지 않는 화합물(Unretained compound)이나 약한 용매가 주입될 수 있고, 이 물질의 머무름 시간을 t_0 로 할 수 있다.¹³ 불감시간의 효과는 거의 모든 크로마토그래피에서 보여진다. 특히 LC보다 GC에서 크며, 불감시간 효과가 작으면 다른 유사한 현상으로부터 구별하기(Baseline disturbance)가 어렵고, 크면 분리에 영향을 주어 분리와 정량(Separation and quantitation)에 절충(Compromise)이 필요하다. 불감시간은 정지상에 머무르지 않는 물질의 머무름 시간을 의미함으로 크로마

토그래픽 인자들 계산을 위한 일차적 계산 기준(Criteria)과 보정(Correction)의 의미를 내포하고 있다. 현대에 와서 급속한 컬럼의 발달로 충전 컬럼이 OTC(Open tubular column)로 대체되어 사용되면서 t_0 를 결정하기가 더욱 어려워졌다.

본 연구에 사용된 용매(DMSO; Dimethyl sulfoxide)는 비양성자성의 강한 극성 용매로 강력한 용해력을 가지고 있어 의약품에 잔류된 극성 용매를 용출하거나, 작업환경 공기 중의 극성 용매들을 흡착시킨 흡착제(예; silica gel)로부터 극성 유기 용매들을 탈착¹⁴하는 데 매우 유용하게 사용되었다. 그러나 일반 용매와 달리 비점(bp; 189 °C)이 높아 분리 물질의 뒤에서 용출이 된다. 현재까지 분리 물질들 뒤에 용출되는 용매의 사용 시스템에서, t_0 를 결정하는 방법을 적용한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 GC-OTC/FID (Gas chromatography-Open tubular column/ Flame ionization detector)로 분리 시 DMSO의 t_R 을 이용하여 쉽고 편리하게 t_0 를 결정할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 본 연구에서는 DMSO의 t_R 을 수학적 전환(상용로그로 전환)을 통해 불감시간(t_0)을 결정하는 방법을 개발하여 현재 통용되는 기본 인자들(t_R , k , α)의 계산에 적용하고, 정당한 불감시간의 개념을 일반화할 수 있는지를 검토하였다.

연구 대상 및 방법

대상물질 및 시약

본 연구에 사용된 시약은 Methanol, Ethanol, Isopropanol, Dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 CH₄를 사용하였다. Methanol은 Junsei (순도 99.8%, 비중 0.791), Ethanol은 J. T Baker (순도 99.9%, 비중 0.789), Isopropanol은 J. T Baker (순도 99.84%, 비중 0.78), DMSO는 Junsei (순도 99.0%, 비중 1.101), CH₄는 유기물질 등의 혐기성 소화과정에서 발생하는 혼합 가스(CH₄; H₂S=6;4)를 사용하였다. 주 대상 분석 물질은 Methanol이며, Ethanol, Isopropanol은 시험에 간섭 물질로 사용하였다. CH₄는 t_0 를 얻기 위한 비교 reference 물질로 사용하였다.

기기 분석조건

Gas chromatograph; Thermo Finnigan Trace GC attached auto sampler & FID

Column; HP-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane), OTC (open tubular column), length 50 m, i.d 0.32 mm, film thickness 0.25 μ m

Temperature; Injector 200 °C, Column 45 °C, 4 min, 15 °C/min to 180 °C (gradient), Detector 250 °C

Flow rate; N₂ 30 ml/min (column 2 ml/min, make-up 28 ml/min), H₂ 35 ml/min, Air 350 ml/min

Injection volume; 2 μ l

표준 용액 조제

Methanol의 표준 용액은 작업환경 공기 중의 노출 기준 (TLV 및 STEL)을 고려하여 공기 10 L를 채취하였을 때의 0.1~2배 범위 중 약 1배의 농도로 조제하였다. Methanol, Ethanol, Isopropanol의 양은 실험의 용이성을 고려하여 각 1 μ l를 DMSO 1 ml가 들어있는 2 ml vial에 넣고 고무마개를 한 후 알루미늄으로 캡핑(Capping)을 하여 실험 중 5 °C 냉장고에 보관하면서 사용하였다. CH₄는 혐기성 가스가 발생하는 현장에서 1 L Polyester Aluminum bag에 받아 이 중에 1 ml를 주사기로 뽑아 1 ml DMSO가 들어있는 Capping된 2 ml 바이알에 넣어 용해하였다.

연구 방법

본 연구에서는 일반적으로 비극성이나 약한 극성의 용매류의 분리 정량에 많이 사용되는 정지상인 HP-5 (5% diphenyl-95% dimethyl polysiloxane)가 결합된 OTC (Open tubular column) 컬럼을 사용 시 머무름 시간이 극성인 알코올류와 중첩 가능성이 높은 CS₂나 CS₂와 보조 용매를 사용하지 않고, 알코올류와 완전 분리되어 용출되는 강력한 용해력을 가진 DMSO를 사용하였다. 또한 알코올 표준용액을 사용하여 동일 조건하에서 반복성(Repeatability; 6회) 시험을 통해 상대표준편차가 기준(1~2%)¹⁵을 만족하는지를 확인하였다.

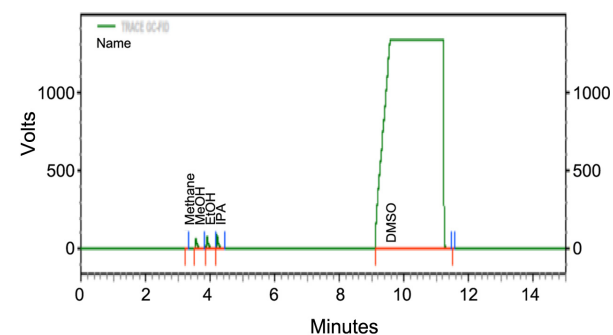
Chromatography에서 t₀를 결정하기 위하여 분석 물질의 앞에 용출되는 Ghost peak (HPLC)나 Marker (Table 1) 그리고 용매 피크에 대해 직접적으로 t₀를 결정할 수 있지만 분석 물질 뒤에 용출되는 용매를 사용 시는 t_R, k', α 계산을 위한 t₀의 결정이 더욱 어렵다. GC에서 t₀를 구하기 위해 직접적 방법과 간접적 방법이 있으나 실제로 정지상에 머무르지 않는 물질은 없기 때문에 간접적 방법이 요구되었다.¹⁶ 그러나, t₀를 구하기 위한 간단하고 정확한 방법은 없다. 따라서 실험적 응용을 위하여 제시된 대부분의 방

법들이 사용될 수 있다. t₀를 구하기 위하여 본 연구에서는 용매인 DMSO의 머무름 시간을 사용하여 기준 시간 (Reference time)을 설정하기 위해 DMSO의 머무름 시간을 상용로그 함수로 간단히 수식 변환을 하였다 {f(x)=log t_{R(DMSO)}→t₀}. 상용대수화한 방법의 타당성을 확인하기 위하여 일반적으로 FID에 많이 사용된 CH₄의 t_R과 DMSO의 t_R을 자연로그로 전환한 값 {ln t_{R(DMSO)}}과 비교하여 타당성을 확인하였다. 또한 분석 조건의 변화(완전성 실험; 이동상 흐름 속도와 컬럼온도)에 따라 상용로그 함수로 변환한 t₀값의 변화를 확인하였다. 이들 데이터를 사용하여 각 물질의 t_R, k' 및 α 를 비교하였다.

결과 및 고찰

알코올류 및 CH₄의 분석

연구 대상 및 방법 부분에 기재된 기기분석 조건으로 각 표준용액을 분석하였다. 이들의 크로마토그램은 Fig. 1,

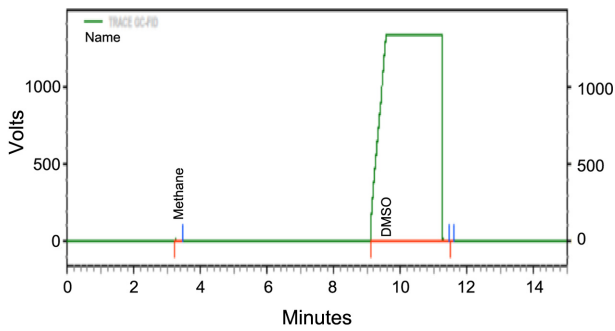


No.	Name	Retention Time	Area
1	Methane	3.247	604261
2	MeOH	3.560	19315247
3	EtOH	3.887	27227986
4	IPA	4.207	28377664
5	DMSO	9.573	15236008267

Figures 1. Chromatogram of CH₄, methanol, ethanol, isopropanol and DMSO.

Table 1. The unretained markers used to gas and liquid chromatography

Classification	Marker	Remark
GC	TCD	H ₂ , N ₂ , air, inert gas (He, Ne, Ar)
	FID	CH ₄ , butane
	ECD	Methyl chloride, CCl ₂ F ₂
	FPD	Vinyl chloride, SF ₆
	TID(NPD)	Acetonitrile
	ELCD	Vinyl chloride
	MSD	CH ₄ , butane, air
HPLC	NPC	Benzene
	RPC	1. Uracil, 2. Sodium nitrate, 3. More than Nitrite 3×10 ⁻⁶ mole 4. 0.01% Potassium bromide



No.	Name	Retention Time	Area
1	Methane	3.252	2069718
	MeOH		
	EtOH		
	IPA		
2	DMSO	9.588	15268675331

Figures 2. Chromatogram of CH₄, and DMSO

Fig. 2와 같다. 분석 결과 CH₄, Methanol, Ethanol, Isopropanol을 동시에 분석하였을 때와 CH₄만을 분석하였을 때의 CH₄의 t_R은 차이가 없었다. Fig. 1의 크로마토그램을 동일 조건하에서 3회 분석한 결과는 Table 2에 보여진다. 3회 분석한 평균 머무름 시간은 CH₄ 3.251, Methanol 3.548, Ethanol 3.892, Isopropanol 4.212, DMSO 9.551분이었다.

반복성(Repeatability) 실험

본 분석 방법의 검증(Validation)을 확인하기 위한 항목인

Table 2. Each retention time of CH₄, methanol, ethanol, isopropanol, and DMSO

	CH ₄	MeOH	EtOH	IPA	DMSO	Remark
1 st	3.247	3.560	3.887	4.207	9.573	
2 nd	3.252	3.517	3.895	4.215	9.540	
3 rd	3.253	3.568	3.895	4.215	9.540	
AV.	3.251	3.548	3.892	4.212	9.551	
σ _{n-1}	0.003	0.022	0.004	0.004	0.016	
r.s.d. %	0.09	0.62	0.10	0.09	0.16	

Table 3. Repeatability for alcohol standard solution

No.	Retention time				Remark
	MeOH	EtOH	IPA	DMSO	
1	3.580	3.888	4.205	9.565	
2	3.558	3.888	4.205	9.580	
3	3.560	3.888	4.207	9.567	
4	3.585	3.895	4.212	9.570	
5	3.563	3.893	4.208	9.580	
6	3.570	3.900	4.218	9.582	
Average	3.569	3.892	4.209	9.574	
σ _{n-1}	0.010	0.004	0.004	0.007	
r.s.d. %	0.28	0.10	0.10	0.07	
w _b (=σ _{n-1})	0.04	0.016	0.016	0.028	

반복성 실험을 위해 알코올 표준용액을 사용하여 동일한 분석 조건으로 6회 반복성 실험을 하였다. 그 결과는 Table 3에 보여진다. 반복성 실험에 의한 상대 표준편차는 MeOH 0.28%, EtOH 0.1%, IPA 0.1%, DMSO 0.07%로 기준(1~2%)¹⁵을 만족하였다. 또한 반복성 실험에서 얻을 수 있는 표준편차의 4배(4σ_{n-1}=w_b)는 기준선 폭(w_b; width of baseline)으로 크로마토그래피의 다른 항목인 이론단수(n; number of theoretical plates, n=16(t_R/W_b)²) 및 분리능(R_s; resolution, R_s=2(t_{R2}-t_{R1})/(W_{b1}+W_{b2}))을 계산하기 위하여 사용된다.

CH₄ t_R과 ln t_{R(DMSO)} 적합성 검토 및 본 방법(log t_{R(DMSO)})과의 비교

GC의 FID를 사용 시 CH₄는 유일한 신호(Signal)를 보이므로 t₀ 결정을 위한 Marker로 많은 논문서 사용하였지만 이동상의 흐름 속도나 온도의 변화에 유사한 약점을 보이므로 사용에 조심을 기하여야 한다. 주어진 동일한 조건으로 t₀를 구하기 위해 직접법이나 간접법이 사용되지만 모든 방법이 같은 값을 산출하지는 않는다. 직접적인 방법으로 t₀를 구하기 위해 CH₄를 사용하지만 실제로 정지상에 머무르는 물질은 거의 없으므로 이 값도 의심스럽다.¹⁷ 그러나 본 연구에서도 비교물질로 CH₄를 사용하였다. CH₄의 t_R인 3.251분을 t₀로 설정하여 각 알코올의 용량 인자(k'=t_R/t₀)를 계산 시 MeOH 0.091, EtOH 0.197, IPA 0.296로 k'의 일반기준인 1<k'<10¹² 또는 2<k'<8¹⁸을 만족하지 못하였다.

DMSO의 t_R을 자연로그화한 ln t_{R(DMSO)}을 t₀=2.256로 했을

때도 MeOH 0.572, EtOH 0.725, IPA 0.867로 k' 의 일반기준인 $1 < k' < 10$ 을 만족하지 못하였다. 그러나 본 연구에서 제시한 $\log t_{R(DMSO)}$ 로 계산된 $\log 9.551=0.980$ min를 이용하여 계산된 k' 값은 MeOH 2.620, EtOH 2.971, IPA 3.298로 k' 의 일반기준인 $1 < k' < 10$ 을 만족하였다. 따라서 적합한 t_0 가 결정되어야 그에 연관된 k' 값도 적합한 수준을 줄 수 있다. 따라서 본 시스템과 같이 분리 물질보다 용매가 뒤에서 용출되는 계에서 t_0 를 구하기 위하여 CH_4 의 t_R 이나 $\ln t_{R(DMSO)}$ 를 적용하는 것보다 $\log t_{R(DMSO)}$ 를 적용하는 것이 더 적합하다고 사료된다. 또한 분리 인자(α)는 이웃한 두 크로마토그램의 상대적 머무름 비로 적합한 t_R 이나 k' 로 계산되어야 한다. α 의 일반적인 적합한 범위는 $1 < \alpha < 2$ 이다. 그 결과는 Table 4에 보여진다.

완건성 실험(이동상 흐름 속도, 컬럼 온도 변화)에 따른 k' 와 α 의 비교

분리 물질의 t_R 도 분석 조건의 변화에 따라 조금씩 변화

고 이에 따라 k' 값도 변한다 그러나 변화된 각 조건에서의 t_0 를 보정함으로써 t_R 과 k' 의 변화 폭을 줄일 수 있어 변화된 조건에서의 객관적 비교가 가능하다. 이동상 흐름 속도를 1.5→2.0→2.5 ml/min로 변화 시 MeOH에 대하여 t_0 를 보정 안 했을 때 t_R 의 변화 폭이 4.253→3.547→3.100으로 1.153 변화하였으나 t_0 (1.018→0.982→0.956) 보정 시 t_R' 이 3.235→2.565→2.144로 1.091로 변화 폭이 0.062 (1.153-1.091=0.062) 줄었다. EtOH에서는 2.219 (4.620-3.383)에서 1.175 (3.602-2.427)로 1.044 줄었고, IPA에서는 1.302 (4.970-3.668)에서 1.24 (3.952-2.712)로 0.062가 줄었다. 따라서 이 비율만큼 k' 도 조정이 된다. 이 결과는 Table 5에 보여진다.

컬럼 온도를 35→45→55→65 °C로 변화 시 MeOH은 t_R 이 0.285 (3.672-3.390)에서 t_R' 이 0.163 (2.658-2.495)로 0.122가 조정되고, EtOH은 t_R 이 0.545 (4.118-3.573)에서 t_R' 이 0.428 (3.104-2.676)로 0.117이 조정되고, IPA는 t_R 이 0.763 (4.545-3.782)에서 t_R' 이 0.676 (3.531-2.855)로 0.087이 조정되었다.

Table 4. Comparison of t_R' , k' and α value according to CH_4 t_R , $\ln t_{R(DMSO)}$ and $\log t_{R(DMSO)}$

t_0		MeOH, 3.458	EtOH, 3.892	IPA, 4.212	DMSO, 9.551	Remark
CH_4 $t_R=3.251$	t_R'	0.297	0.641	0.961	6.300	
	k'	0.091	0.197	0.296	1.938	
	α	2.16		-	-	
			1.50			
$\ln t_{R(DMSO)}$ $=2.256$	t_R'	1.292	1.636	1.956	7.295	
	k'	0.572	0.725	0.867	3.234	- $t_R'=t_R-t_0$ - $k'=(t_R-t_0)/t_0$ - $\alpha=k_2'/k_1'$
	α	1.26		-	-	
			1.20			
$\log t_{R(DMSO)}$ $=0.980$	t_R'	2.568	2.912	3.232	8.571	
	k'	2.620	2.971	3.298	8.745	
	α	1.13		-	-	
			1.32			

Table 5. Comparison of t_R' , k' and α according to mobile phase change

Flow rate, ml/min		MeOH	EtOH	IPA	DMSO	Remark
1.5	t_R	4.253	4.620	4.970	10.433	
	t_R'	3.235	3.602	3.952	9.415	
	k'	3.178	3.520	3.882	9.248	$\log 10.433=t_0$ $=1.018$
	α	3.520/3.178=1.107		-	-	
			3.882/3.520=1.102			
2.0	t_R	3.547	3.872	4.193	9.612	
	t_R'	2.565	2.890	3.931	8.630	
	k'	2.612	2.942	3.270	8.788	$\log 9.612=t_0$ $=0.982$
	α	2.942/2.612=1.126		-	-	
			3.270/2.942=1.111			
2.5	t_R	3.100	3.383	3.668	9.030	
	t_R'	2.144	2.427	2.712	8.074	
	k'	2.242	2.538	2.836	8.446	$\log 9.030=t_0$ $=0.956$
	α	2.538/2.242=1.132		-	-	
			2.836/2.538=1.117			

Table 6. Comparison of t_R' , k' and α according to mobile phase change

Colum temp. °C	MeOH	EtOH	IPA	DMSO	Remark	
35	t_R	3.672	4.118	4.545	10.350	log10.350= t_0 =1.014
	t_R'	2.658	3.104	3.531	9.356	
	k'	2.621	3.061	3.482	9.207	
	α	3.061/2.621=1.168		3.482/3.061=1.138		
45	t_R	3.547	3.872	4.193	9.612	log9.612= t_0 =0.982
	t_R'	2.565	2.89	3.211	8.630	
	k'	2.612	2.942	3.270	8.788	
	α	2.942/2.612=1.126		3.270/2.942=1.111		
55	t_R	3.462	3.703	3.943	8.747	log8.747= t_0 =0.942
	t_R'	2.52	2.761	3.001	7.805	
	k'	2.675	2.930	3.186	8.286	
	α	2.930/2.675=1.095		3.186/2.930=1.087		
65	t_R	3.390	3.573	3.752	7.895	log7.895= t_0 =0.897
	t_R'	2.495	2.676	2.855	6.998	
	k'	2.779	2.983	3.182	7.802	
	α	2.983/2.779=1.073		3.182/2.983=1.066		

따라서 컬럼 온도 변화에 따른 k' 변화는 MeOH에서 2.621 → 2.612 → 2.675 → 2.779, EtOH에서는 3.061 → 2.942 → 2.930 → 2.983, IPA에서는 3.482 → 3.270 → 3.186 → 3.182로 변화 폭이 매우 미미하여 분석 조건의 변화에 따른 k' 을 비교하기가 가능하였다. 특히 흐름 속도 변화보다 컬럼 온도 변화에 대해 안정적이었다. 이 결과는 Table 6에 보여진다.

결론

GC-OTC/FID 계에서 극성 용매(Alcohols)를 분리 분석하기 위하여 탈착 용매로 강력한 용해력을 가진 비양성자성인 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 사용하였다. 이 계에서 알코올들 보다 비점이 높은 DMSO가 늦게 용출이 된다. 이런 계에서 크로마토그래픽 인자인 조정된 머무름 시간 ($t_R' = t_R - t_0$)과 용량 인자 $\{k' = (t_R - t_0)/t_0\}$ 및 분리 인자 $\{\alpha = (t_{R2} - t_0)/(t_{R1} - t_0) = k_2/k_1\}$ 를 구하기 위하여 불감시간(t_0)이 필요하다. 그러나 이런 계에서 t_0 를 구하기 위한 보고가 현재까지 된 바 없어 본 연구에서는 t_0 를 구하는 방법을 개발하고자 하였다. 연구 결과는 다음과 같다.

1. t_0 를 구하기 위하여 DMSO의 t_R 을 상용로그로 전환하였다. 이 방법은 간접법을 활용한 수학적 전환으로 매우 쉽고 간편하다.

$$f(x) = \log t_{R(DMSO)} \rightarrow t_0$$

$$t_0 = \log 9.551 = 0.980$$

2. 개발된 방법의 적합 여부를 확인하기 위하여 직접법에 사용되는 CH_4 의 t_R 과 다른 방법인 자연로그로의 전환 값 $\{\ln t_{R(DMSO)}\}$ 을 이용한 t_0 값과 비교하였다. 세 가지 방법 중 본 연구에서 개발한 방법이 연관된 t_R, k', α 를 계산하는데 적합하였고 일반적 기준인 $1 < k' < 10, 1 < \alpha < 2$ 도 만족하였다.

3. 이와 동일한 계에서 다른 극성용매(Acetone, MC, MEK, MIBK)¹⁴에 대해서도 t_0 를 결정하기 위하여 동일한 방법을 활용할 수 있다.

REFERENCES

1. Watanachaiyong, T.; Jeyashoke, N.; Krisnangkura, K. *J. Chromatogr. Sci.* **2000**, 38, 67.
2. Quintanilla-López, J. E.; Lebron-Aguilar, R.; Garcia-Domínguez, J. A. *J. Chromatogr. A* **1997**, 767, 127.
3. Hinshaw, J. V. *LC GC N. Am.* **2015**, 11, 850.
4. Touabet, A.; Badjah Hadj Ahmed, A. Y.; Maeck, M.; Meklati, B. Y. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1986**, 9, 456.
5. Smith, R. J.; Haken, J. K.; Wainwright, M. S. *J. Chromatogr. A* **1985**, 334, 95.
6. Smith, R. J.; Haken, J. K.; Wainwright, M. S.; Madden, B. G. *J. Chromatogr. A* **1985**, 328, 11.
7. Colin F. Poole, *The Essence of Chromatography*; Elsevier: 2003; p 140.
8. Gonzales, F. R. *J. Chromatogr. A* **1999**, 832, 165.
9. Gastello, G.; Vezzani, S.; Moretti, P. *J. Chromatogr. A* **1994**, 677, 95.

10. Frank M. D. Whitman College, *Chromatographic Theory (section1.2)*; 2008.
 11. Smith, R. J.; Nieass, C. S.; Wainwright, M. S. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, *9*, 1387.
 12. www.CHROMacademy. com, Theory of HPLC Chromatographic Parameters, 3~8.
 13. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd ed.; John Wiley & Sons: Chap. 2, 1979; p 24.
 14. Oh, D. S.; Kim, S. S.; Lee, S.; Hwang, K. C. *J. Korean Soc. Occup. Environ. Hyg.* **2016**, *26*, 20.
 15. Analytical method validation guideline, <https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:iGp05FtY1QcJ:https://www.editage.co.kr/insights/guidelines-for-analytical-method-validation-how-to-avoid-irreproducible-results-and-retractions+&cd=1&hl=ko&ct=clnk&gl=kr>
 16. The Hold-up Volume Concept In Column Chromatography (Iupac Recommendations 2000), José Antonio García Domínguez1 And José Carlos Díez-masa 2.
 17. Ambrus, L. *J. Chromtogr. A* **1984**, *294*, 328.
 18. CDER (Center for Drug Evaluation and Research), U.S. Food and Drug Administration. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods; FDA, Rockville, MD; Nov 1994.
-