

= 총설 =

- 고체상 미량추출법의 이론과 활용 -

김택제*

경기대학교 화학과
(2002. 9. 18 접수)

Theory and Applications of Solid Phase Microextraction

Kim Teak Jea*

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon, Kyonggi-do, 442-760, Korea
(Received Sep. 18, 2002)

1. 서 론

분석 과정은 분석 목적과 시료 특성에 따라 다르지만 일반적으로 여러 단계로 되어 있다. 그 단계로서 시료 채취, 시료 조제, 분리, 정성·정량 분석, 통계적 평가 및 검토가 있다. 각 단계는 정확한 분석결과를 얻는 데에 매우 중요하다. 대부분의 분석 기기들은 용액화 과정으로 분석이 이루어지기 때문에 시료 조제 단계가 필요하고 시료 매트릭스에 따라, 특히 유기물 분석에서 유류, 생물체, 단백질 또는 용해되지 않는 고형체가 있는 경우, 물을 바탕으로 이루어진 시료, 또는 시료중 분석물들의 함량이 매우 낮아서 농축이 필요할 때 시료 조제의 필요성이 있다.

시료 조제 단계에서는 추출, 분리에 의한 정제 (cleanup) 및 농축 과정이 있다. 미량분석에서 시료중 분석물에 대한 정확한 분석결과를 얻기 위해 일반적으로 시료 채취와 조제하는 데에 총 분석시간의 75% 이상이 소요된다고 알려져 있다.^{1,2,3}

시료 조제 방법은 좋은 분석 성능, 즉 효율성 (efficiency), 선택성 (selectivity), 및 다양한 시료와 분석물에 대한 적용성을 가지고 있어야 한다. 그래서 이상적인 새로운 시료 조제 기법은 조작과정이 쉽고 저렴

한 비용이 들고 분석기와 바로 연결되어야 한다.

오늘날 널리 사용되고 있는 시료조제 기법 중 용매가 거의 쓰이지 않는 시료조제 기법을 분류하면 Fig.1과 같다.

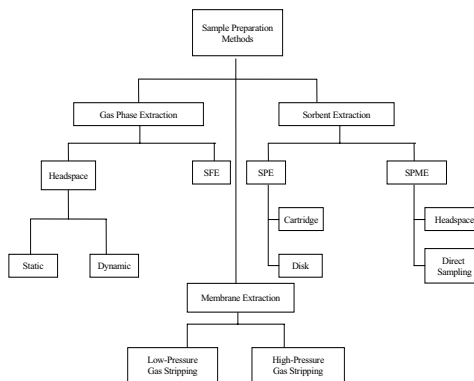


Fig. 1. Classification of solvent-free sample preparation methods.⁴

위의 결과에서 시료 조제 방법의 기본적인 원리는 시료 매트릭스와 추출상(기체, 막 또는 수작제)사이의 분석물들을 분배시키는 기법이다. 어떠한 과정에서도 유기용매 사용량이 매우 소량이거나 전혀 유기용매를 사용하지 않는 기법이다.

첫째로 기체상 추출법은 정적 시료(용액) 상층부 추출 기법 (static headspace extraction)과 동적 시료(용액)상부

* Corresponding author
Phone : +82+(0)31-257-8874 Fax : +82+(0)31-257-8874
E-mail : tjkim0513@hanmail.net

Table 1. Comparing features of solid phase extraction with SPME

Feature	SPE	SPME
Sample matrices	Liquid-organic or aqueous and some semi-solids such as tissue.	Aqueous liquids, solids, gas (rarely).
Sample pretreatment	Blood, tissue and some environmental samples usually require pretreatment to remove solids or proteins; many liquid samples do not.	Sample pretreatment usually not required for volatiles. Analytes not amenable to headspace sampling may require some matrix cleanup.
Analytes	Semivolatiles and slightly volatile compounds; a recovery problem with volatiles.	Volatile and semivolatile compounds.
Use of organic solvents	Environmental samples: typically 25 mL to extract one liter, versus 300~600 mL with liquid-liquid extraction. Biological samples: 4-8 mL (same as liquid-liquid extraction)	None.
Recovery of analytes	Generally, recoveries close to 100% are expected.	Equilibrium method-quantitation usually by comparing to spiked blank matrix or by standard additions.
Government regulatory agency approval	Several approved methods.	Relatively new technique (no approved methods at present).
Advantages	Better sensitivity because full recovery is possible from samples as large as one liter.	Much simpler. Usually the user places samples in vials and starts absorbing onto fiber.

Table 2. Comparing features of purge & trap with SPME

Feature	Purge & Trap	SPME
Sample matrices	Aqueous liquids and solids	Aqueous liquids, solids, gas(rarely).
Sample pretreatment	None for many samples. Matrix modifiers sometimes used such as salting out or adjusting pH.	None for many samples. Matrix modifiers sometimes used such as salting out or adjusting pH.
Analytes	Volatile compounds(up to approximately 300 ℃).	Volatile and semivolatile compounds.
Use of organic solvents	None.	None.
Recovery of analytes	Recoveries up to 100% are expected.	Equilibrium method-quantitation usually by comparing to spiked blank matrix or by standard additions.
Advantages	Greater sensitivity(~100 fold)expected for purgeable compounds.	Lower capital cost for dual function hardware(liquid injection and SPME) and lower costs for maintaining and trouble-shooting hardware. Require no bench space. No problems with foaming samples.

추출 기법 (dynamic headspace extraction)이 있고 그리고 초임계 유체 추출법 (supercritical fluid extraction, SFE)⁵으로 세분된다. 동적 상층부 기법으로서 씻어내기 및 포착 (purge & trap)방법⁶이 있다. 시료 (용액) 상층부 시료중 휘발성 유기 화합물들을 분리해서 바로 분석하게 된다.

초임계 유체 추출법 (SFC)에서 초임계 유체는 액체와 비교해서 기체가 가지고 있는 빠른 물질 전달 (mass transfer) 특성과 기체와 비교해서 비교적 큰 밀도를 가진 액체의 큰 용해도의 특성을 가지고 있다.

막 추출법 (membrane extraction)⁷은 시료로부터 고분자물에 의한 분석물들의 추출과정과 그 고분자상으로부터 기체상에 의해 분석물의 재추출과정으로 이루어진다. 이 기법은 휘발성 유기 화합물들과 반휘발성 유기 화합물 등의 단리 (isolation)에 활용된다. 수착제 추출법 (sorbent extraction)은 고체상 추출법 (solid-phase extraction, SPE)과 고체상 미량 추출법 (solid-phase microextraction, SPME)으로 세분된다.

수착제를 사용하는 SPE와 SPME 기법의 활용적인 특징을 간략하게 비교하면 Table 1과 같다.

기체상 추출법의 하나로서 purge & trap 기법과 SPME 기법의 활용적인 특징을 간략하게 살펴보면 Table 2와 같다.

위의 결과에서 purge & trap과 SPE 기법들은 분석물의 진량 추출 (exhaustive extraction) 기법인데 SPME 기법은 분배계수에 의한 평형 분배 기법이라는 점에서 기본 원리가 다르다.

본문에서는 최신 시료 조제법으로서 SPME 기법이 대학 교재⁸에서 소개되었고 지금까지 발표된 많은 문헌들 중에서 총설들을 살펴보면 물시료중 유기물들의 분석⁹, 환경시료중 triazine 제조제들의 분석¹⁰, 잔류농약 분석¹¹과 식품분석¹²이 있고 단행본 3권^{2,13,14}이 출판되었다. 논문에서는 SPME 기법이 어떠한 기본 이론에서 수행되는가를 기술하고 감도의 향상과 분석시간의 단축 문제를 이론을 바탕으로 설명하고 SPME에 의한 분석법 개발과 발표된 관련 문헌들중 식품중 잔류농약 분석법들만을 소개하려고 한다.

2. SPME의 이론과 방법 개발

2.1 SPME 장치와 시료채취

고체상 미량 추출법 (SPME)은 길이가 1 cm(더러는 2 cm)이고 외경이 0.11 mm되는 용융 실리카 섬유 (fiber)에 수착 (흡수나 흡착)용 고분자를 입힌 (더러는 화학 결합이나 다리 결합시킨) 유리 섬유 (glass fiber)

를 사용해서 시료중 분석물들을 수착시켜 추출과 농축하는 기법이다.¹⁵ 유리 섬유는 마치 기체 크로마토그래피의 모세관 컬럼 (capillary column)처럼 화학적으로 불활성의 성질을 가지고 있다.

SPME 장치는 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 일정한 두께로 된 고분자를 입힌 섬유와 일반적인 마이크로 주사기의 변형된 모양으로 되어있다.

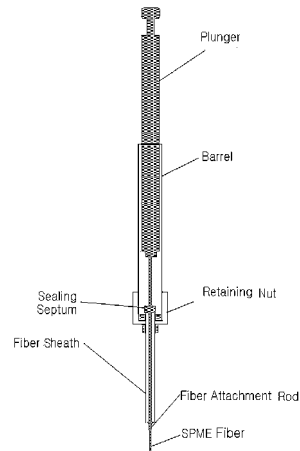


Fig. 2. SPME fiber with holder.

SPME의 추출기법은 2가지 과정으로 되어 있는데 첫째로 시료와 수착 섬유 사이에서 분석물들의 분배과정이고 둘째로 수착 섬유 (sorbent fiber)에 농축된 분석물들을 분석기들 (GC나 HPLC)에서의 탈착과정으로 되어있다. 분석물들을 추출하기 위해 수용액 시료를 담은 유리병을 격막과 뚜껑으로 밀봉한 다음 SPME 주사기로 격막을 통해 뚫어서 수착 섬유를 직접 시료에 담그거나 시료 상층부 (headspace)에 노출되도록 주사기 밀대를 조절한다. 정해진 시간 동안 분석물들을 수착시킨 다음에 수착 섬유를 원래 위치로 조절해서 유리병에서 주사기를 뽑아서 분석기에 주입한다. 다시 분석기의 주입구내에 수착 섬유를 노출시켜 분석물들을 열적 (GC의 경우) 또는 용매 (HPLC의 경우)에 의해 탈착시킨다.

분석물들의 종류별 수착 섬유에 대한 친화성 (분배계수)은 SPME의 시료 채취 시 그의 선택성과 수착량에 대해 매우 중요하고 그 과정에서 시료 매트릭스와 수착

섬유의 2상이 분석물들에 대해 경쟁과정이 일어난다.

2.2 SPME 이론과 감도

SPME 기법은 앞서 기술한 바와 같이 시료와 수작 섬유상간 분석물의 화학평형을 바탕으로 분석물들을 추출하는 기법이며서 분석물들은 분석시료로부터 전량 추출하는 과정은 아니다. Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 SPME로 추출하는 방식에 따라 다르지만 시료(고체시료를 포함), 용매(추출용)와 수작 섬유 3성분계간에 평형분배들이 일어난다. 첫째로 수용액 시료와 수작 섬유(직접 액체 시료 채취법이라 함)간 그리고 둘째로 수용액 시료와 시료 상층부간과 시료 상층부와 수작섬유상간(시료 상층부 시료 채취법이라고 함)의 추출방법들이 있다.

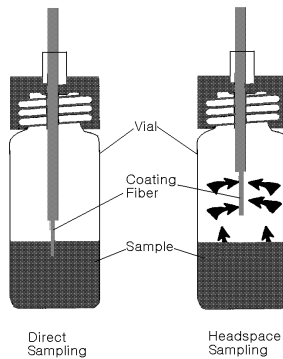


Fig. 3. Modes of SPME extraction.

따라서 SPME에서 분석물들이 수작되는 양은 일반적으로 3성분계의 전체 평형에 관련된다. 평형이 이루어진 3성분계에서 분석물들의 분포는 다음 식과 같다.

$$C_0 V_s = C_s V_s + C_h V_h + C_f V_f \quad (1)$$

여기에서 C_0 는 수용액 시료중 최초 분석물의 농도이고 V_s 는 유리병에 담겨진 수용액 시료의 부피이다. C_s , C_h 와 C_f 는 각각 수용액 시료, 시료(용액) 상층부와 수작제(정지상)에서 분석물의 평형 농도들이다. V_h 와 V_f 는 각각 시료(용액) 상층부와 수작제의 부피를 나타낸다.¹⁶

2.2.1 직접 액체시료의 채취법

수작제 상과 수용액 상간의 분석물의 분배계수 (K_{fs})는 다음과 같다.¹⁷

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad (2)$$

이 분배계수는 주어진 계와 일정 온도에서 상수가 되고 이는 분석물에 대해 수작제의 종류와 그에 따른 선택성이 다르면 다른 값을 갖게 된다(Table 3).

Table 3. Commercially available SPME fibers

Fiber Coating Type	Coating Stability	Max Temp.	Polarity
PDMS, 100 μm	Nonbonded	280 $^{\circ}\text{C}$	Nonpolar
PDMS, 30 μm	Nonbonded	280 $^{\circ}\text{C}$	Nonpolar
PDMS, 7 μm	Bonded	340 $^{\circ}\text{C}$	Nonpolar
Polyacrylate, 85 μm	Crosslinked	320 $^{\circ}\text{C}$	Polar
CW-DVB, 65 μm	Crosslinked	260 $^{\circ}\text{C}$	Polar
PDMS-DVB, 65 μm	Crosslinked	270 $^{\circ}\text{C}$	Bipolar
Carboxen-PDMS, 75 μm	Crosslinked	340 $^{\circ}\text{C}$	Bipolar
CW-TPR HPLC, 60 μm	Crosslinked	-	Polar
PDMS-DVB HPLC, 50 μm	Crosslinked	-	Bipolar

PDMS : polydimethyl siloxane.

CW-DVB : carbowax-divinylbenzene.

TPR : templated resin.

수용성 시료상과 수작 섬유상간 분석물의 분배비 (partition ratio) κ' 는 다음과 같다.

$$\kappa' = \frac{C_f V_f}{C_s V_s} = K_{fs} \cdot \frac{V_f}{V_s} = \frac{n_f}{n_s} \quad (3)$$

여기에서 n_f 와 n_s 는 각각 수작제 상과 수용액 상에서 분석물의 평형 몰수이다.

SPME 수작 섬유와 분석물간에 친화력이 보다 크면 분석물의 분배계수는 매우 큰 값을 가지게 되고 따라서 높은 농축효과를 가지게 되고 감도도 좋아진다.¹⁸

완전 추출법과 달리 평형 추출법에서는 정확한 정량이

되기 위해 적절한 검정법이 필요하다. 또한 시료 부피 (V_s)에 따라 수착되는 분석물의 양 (n_f)을 알기 위해 첫째로 강, 호수, 우물 또는 대기 등의 현장에서 SPME로 직접 분석물을 추출할 경우에 수착제의 부피 (0.026~0.612 μL)에 비교해서 시료 부피 (>5 mL)가 큰 경우 ($V_s \gg K_{fs}V_f$)에 (3)식을 정리하면 다음 식이 된다 ($n_s/V_s = C_0$).

$$n_f = K_{fs}V_fC_0 \tag{4}$$

위의 식에서 수착제에 흡수된 분석물의 양 (n_f)은 시료중 분석물의 처음 농도에 직접 비례한다. 이 경우에서 분석시료의 부피는 알 필요가 없다.

둘째로 시료부피가 2~5 mL인 경우에 채취한 시료중 수착제에 흡수되는 분석물량은 $K_{fs}V_f$ 만큼 감소되어 다음 식과 같다.

$$n_f = \frac{K_{fs}V_fV_sC_0}{K_{fs}V_f + V_s} \tag{5}$$

(4)식의 경우처럼 수착제에 흡수되는 분석물량 (n_f)은 시료중 분석물 농도에 비례한다. 또한 분배계수가 매우 크다면 $K_{fs}V_f \gg V_s$ 가 되어 $n_f = V_sC_0$ 가 되어 분석물의 대부분이 수착제에 추출된다.

2.2.2 시료 상층부의 채취법

기체상 시료나 비교적 매트릭스가 깨끗한 물시료에서는 직접 액체시료에 수착 섬유를 담구어 분석물을 추출할 수 있다. 그렇지 않은 시료인 경우에 예를 들면 그리스나 기름으로 된 폐기 수용액 시료나 또는 고형물이나 고분자물로 된 불명의 복잡하고 다양한 매트릭스인 토양시료나 슬러지 시료에서 분석물들을 직접 수착섬유를 담구어 추출할 수 없다. 이러한 경우에 액체 시료 위의 공간에서 분석물들을 추출할 필요성이 있다. 앞에서 기술한 바와 같이 SPME의 추출 평형은 3성분 상계에서 이루어진다. 수용액 시료상과 그의 상층부상간의 분배계수 $K_{hs} = C_h/C_s$ 이고 C_h 와 C_s 는 각각 상층부와 수용액 시료상에서 분석물의 평형 농도이다.

수착 섬유상과 상층부상간의 분배계수 $K_{fh} = C_f/C_h$ 이고 C_f 와 C_h 는 각각 수착 섬유상과 상층부상에서 분석물의 평형 농도이다. 수착 섬유상과 수용액상 간의 분배계

수 $K_{fs} = C_f/C_s$ 이고 C_f 와 C_s 는 각각 수착 섬유상과 수용액 상에서 분석물의 평형 농도이다. 따라서 상층부상에서 수착 섬유에 분석물의 흡수되는 양은 다음과 같다.

$$n_f = \frac{K_{fh}K_{hs}V_fV_sC_0}{K_{fh}K_{hs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} = \frac{K_{fs}V_fV_sC_0}{K_{fs}V_f + K_{hs}V_h + V_s} \tag{6}$$

(6)식의 분모의 3개 항들인 수착 섬유 ($K_{fs}V_f$), 상층부상 ($K_{hs}V_h$)와 수용액 상 (V_s)은 각 상에 대해 분석물의 용량을 나타낸다.

시료(용액) 상층부의 채취법과 직접 액체시료의 채취법에서 수착 섬유, 상층부와 시료의 부피들이 일정하다면 분석물의 추출량과 검출한계는 같다.^{17,18}

분석물들의 감도에 영향을 주는 인자들은 어떠한 것이 있으며 SPME에 의한 새로운 방법을 확립하는데에 필요한 실험인자들을 살펴보면 다음과 같다.

첫째로 수착 섬유의 종류를 선택해야 한다. 그의 원리는 분석물들을 GC로 분리할 경우에 정지상의 선택과 같다. Table 3에서 보여주는 바와 같이 분석물의 극성에 따라 수착 섬유의 극성을 선택하면 분석물의 분배계수가 커져서 감도가 좋아진다. 또한 수착 섬유에 입혀진 정지상의 두께와 길이가 커지면 (4)식에서 보여주는 바와 같이 수착 섬유의 부피 (V_f)가 커져서 분석물의 감도가 좋아진다. 그림 4에서 보여주는 바와 같이 정지상 두께가 커지면 분석물 (벤젠)의 추출량이 증가된다.

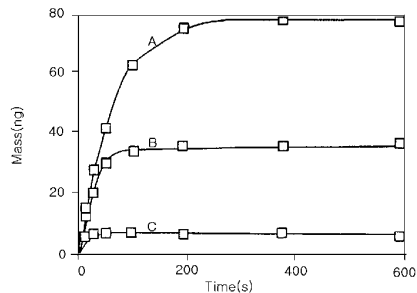


Fig. 4. Effect of coating thickness on the absorption versus time profile for the extraction of 0.1 ppm benzene from a 2,500 rpm stirred aqueous solution. (A) : 100 um thick coating, (B) : 56 um thick coating, (C) : 15um thick coating.

한편 그의 두께가 커지면 보다 많은 분석물이 더 큰 정지상 부피내 침투(확산현상)하는데 소요되는 평형 시간이 길어진다(Fig. 4에서 B나 C곡선에 비해 A 곡선에서).¹⁴ 다시 말하면 주어진 수착 조건에서 같은 화합물이나 다른 화합물들의 분배계수가 커지면 그에 따라 평형시간은 길어진다. 따라서 분석물의 감도가 만족스럽다면 추출시간이 짧은 정지상의 두께를 가진 수착 섬유를 사용해야 한다.

둘째로 수착 섬유와 수용성 시료간의 분배계수(K_{fs})를 증가시키기 위해 정지상의 선택문제는 앞서 말한 바와 같이 매우 중요한 실험인자가 된다(Table 3).

분배계수를 변화시키는 실험인자들로 수착시 온도, 염효과(salt effect)나 시료의 pH 조절(산이나 염기 화합물들에 해당)이 있다.

그 중에서 시료온도만을 살펴보면 온도 변화는 분석

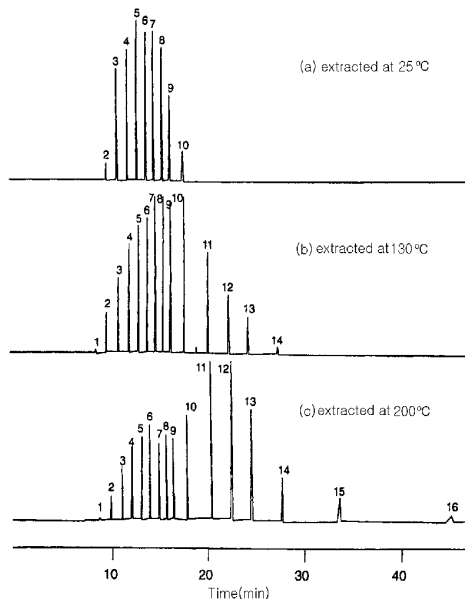


Fig. 5. Total ion current chromatograms of 16 straight chain hydrocarbons sampled by headspace SPME from spiked sand at (a) 25 °C, (b) 130 °C, and (c) 200 °C for 60 minutes. The components are : 1, C₁₀; 2, C₁₁; 3, C₁₂; 4, C₁₃; 5, C₁₄; 6, C₁₅; 7, C₁₆; 8, C₁₇; 9, C₁₈; 10, C₁₉; 11, C₂₄; 12, C₂₈; 13, C₃₂; 14, C₃₆; 15, C₄₀.

물의 분배계수를 변화시켜 SPME 기법의 감도문제에서 중요한 기여를 한다. 일반적으로 시료의 온도증가는 높은 온도가 높은 분석물들에서 감도를 증가시키지만 높은 온도가 낮은 분석물들에서는 감도를 감소시킨다.

온도 증가로 분석물들의 확산계수는 증가되고 그들의 분배계수(K_{fs})들은 감소되어 결과적으로 평형시간은 짧아진다.¹⁴ 이러한 효과로 주어진 수착 섬유에서 분석물들의 추출시간은 최적화할 필요성이 있다.

상층부 추출법에서는 시료온도의 증가는 공간부위로 분석물들의 농도를 증가시켜 보다 빠른 추출을 이룰 수 있다. 첨가해서 분자량이 큰 분석물들이 추출되는 양은 증가된다(Fig. 5).

그러나 보다 휘발성 분석물에서는 온도 증가는 그의 분배계수(K_{fs})를 감소시켜 불리한 결과를 가져온다. 셋째로 시료 매트릭스로 부터 수착 섬유에 분석물들의 이동시간에 의해 추출속도가 결정된다.¹⁵ 각 단계별 과정은 첫째는 고형체 시료에서는 고형체로부터 분석물들의 탈착되는 속도가 있고 둘째는 대기나 액체시료를 통해 분석물들의 이동속도가 있고 셋째는 수착 섬유상 내 분석물들의 확산속도로 이루어진다.

이러한 과정중 하나 또는 여러 과정들이 시료채취 조건들에 따라 다르지만 속도 결정 단계가 된다. 용액중 분석물들을 빠르게 추출하기 위해 Prandtl 계면층을 얇게 되도록 휘젓기(agitation)의 형태로 실험이 이루어진다.¹⁴ 휘젓기 방법은 자석 젓개, 용액에 수착 섬유의 휘젓기, 초음파 처리나 흐름 액체 시료에 수착 섬유의 담그기가 있다.

실제로 시료용액을 자석젓기 하거나 수착 섬유의 휘젓기를 해서 분석물의 평형이 이루어지기 위해 소요되는 시간은 정적 시료 채취법의 시간에 비해서 10배정도 빠르다.

상층부의 시료 채취법에서는 분석물들이 수용성 시료에서 시료 상층부로 그리고 마지막으로 수착 섬유로 질량 이동속도에 따라 평형시간이 정해진다.

휘발성 분석물들은 3성분상계에서 평형 농도가 빠르게 이루어지지만 반휘발성 분석물들은 시료에서 시료 상층부로 그의 질량이동이 느려서 평형시간이 길어진다. 따라서 시료 용액의 휘젓기가 요구된다.

넷째로 GC나 HPLC 주입구 내에서 분석물들의 탈착문제는 크로마토그래피의 분리 효과와 정량의 정밀도에 영향을 준다.¹⁸ GC에서는 열적 탈착과정으로 주입구의 온도를 증가 시키면 수착 섬유상과 기체상(운반기체)간의 수착물들의 분배 계수가 감소하고 또한

온반기체의 일정 흐름은 수작된 분석물들을 쉽게 탈착시키고 온도가 낮은 분석 컬럼의 머리부분에 재농축되게 하여 띠 넓어짐 현상을 최소화시킨다. HPLC에서는 이동상 용매나 세기가 센 유기용매를 사용해서 수작된 분석물들이 탈착된다. 분석물들의 탈착실험을 통해 최적 조건을 설정하여야 한다.

3. 식품시료에 SPME의 활용

SPME기법에 의해 채소류, 과일류, 수용성 음료수 등의 식품 중 잔류 농약의 분석법에 관해 현재까지 알려진 문헌들을 중심으로 농약 종류, 분석 시료, SPME에 의한 분석물 채취법과 추출 수작제의 종류, 분석 기기, 검출한계, 정밀도, 검정 방법을 요약하여 Table 4에 나타내었다. 대부분 식품 중 잔류농약의 분석 기기는 GC를 사용하였으며 검출기로는 질량분석계(MSD)^{19,24}와 전자 포착 검출기(ECD)^{25,26}, 질소인 검출기(NPD)²⁷, 불꽃 광도 검출기(FPD)^{28,29} 등을 사용하였고, 때로는 두 가지 이상의 검출기를 동시에 사용하기도 하였다.³⁰⁻³² 또는 고성능 액체 크로마토그래피/다이오드 배열 검출기(HPLC/DAD)³³를 사용해서 분석하기도 하였다. 꿀 중 잔류농약을 분석하기 위해 SPME기법과 GC/MSD와 효소결합 면역 흡착제 분석법(ELISA)에 의한 시험결과를 비교하기도 하였다.²¹

수용액으로 되어있는 식품들로서 포도주^{19,21,26,30,34} 및 기타 알코올음료^{19,23}, 오렌지 주스²⁰와 기타 과일주스^{29,32}들은 더러 물로 묽혀 SPME fiber를 직접 시료 용액에 담그어 분석물들을 수작했다. 벌꿀²⁷과 꿀^{22,25}, 감자²², 약초²⁴, 과일^{29,32,33} 및 채소류³¹들은 소량의 유기용매(acetone이나 acetonitrile)를 사용해서 농약들을 추출하고 SPME 수작제로 추출하였다.

SPME기법으로 식품 중 잔류농약을 분석하기 위해서 사전에 예비실험으로 농약들을 일정량 첨가시킨 탈염수로부터 SPME 수작제에 대한 최적 추출조건들이 확립되었다.

최적 추출조건으로 첫째로 수용성 시료와 수작제 간에 농약들의 수작 평형시간을 결정하기 위해 수작시간 변화에 따른 농약들의 수작량을 실험하였다.^{23,25,29,30,32} Boyd-Boland등²⁰은 오렌지 주스 중 100 μ m PDMS (polydimethyl siloxane) 수작제를 사용하여 정량 수작시간을 총 분석물량 중 50%이상 수작 평형이 이루어지는 50분으로 결정하였다. 또한 20-60여종의

농약들을 동시에 분석하는 경우에는 각 농약들의 수작 평형시간은 추출과정의 반응속도론적 요인에 의한 영향을 받지 않고 거의 비슷하다고 하였다.

Bao-Huey등²⁴은 약초 중에서 19종의 유기염소계 농약들이 100 μ m PDMS 수작제로 대부분 90분까지는 그들의 수작율이 증가하다가 그 이후부터 120분까지는 수작량이 약간 감소한다고 발표하였다. Fernandez등²⁷은 벌꿀 중에서 유기인계 농약 17종을 분석하였는데 그 결과에서 100 μ m PDMS fiber로 추출하는 것보다 85 μ m PA (polyacrylate) 수작제로 추출할 때 평형시간이 짧아지지만 pyrazophos는 예외였다.

Weiqi Chen등²⁸은 유기인계 농약들 중 ethion은 상대적으로 분자량이 커서 낮은 확산계수를 가지게 되어 수작 평형시간이 길었다. 추출 평형 시간은 물과 식물 시료의 섞는 비(물:희박비)에 따라 별로 차이가 없고 추출시간이 일정하였다. 혼합조건과 추출 부피가 일정한 시료의 경우에 정량추출은 평형시간에서 할 필요가 없다고 하였다.

Simplicio등²⁹은 수작시간을 평형시간보다 짧게 할 경우에 정량결과의 재현성을 좋게 하기 위해 항상 수작시간을 일정하게 해주어야 한다고 하였다. 유기인계 8종 농약은 모두 수작시간이 증가함에 따라 수작량도 계속 증가하여 80분까지도 평형에 도달하지 않았다.

Louise등¹⁹은 첫째로 알코올 수용액과 포도주 중 ethanol함량(0, 5, 10, 15%)이 시료와 수작제간의 평형시간(1, 5, 10, 20, 30, 50, 70분)과 농약들의 수작량과의 관계를 조사하였다. 그 결과에서 수작 평형시간은 ethanol함량에 관계가 없고 그들의 추출효율은 식품 중 matrix와 알코올의 함량에 따라 달랐다(농약의 분배계수가 다름). 순수한 물에 비해 5, 10, 또는 15% 알코올 수용액에 따라 추출효율이 차례대로 감소되었고, 10% 알코올 수용액이 포도주보다 추출 재현성의 좋은 결과는 방해물(suger, tartrate, phenol류)의 영향을 덜 받기 때문이라고 보고하였다.

두 번째로 수작제 종류별 농약의 수작량을 비교·분석하였다. PDMS 수작제의 두께에 따라 농약의 수작량을 비교하였는데 Louise등¹⁹은 분석대상의 농약들에서 30 μ m PDMS 수작제에 비해서 100 μ m PDMS 수작제에서 농약의 수작량들이 대략 2-8배정도 크다고 하였다.

시료 중 잔류농약을 추출하기 위해 사용된 수작제 정지상으로는 PDMS와 PA 수작제들을 주로 많이 비

교하였다. Boyd-Boland²⁰은 95 μm PA와 100 μm PDMS 수착제의 수착량을 비교하였는데 PDMS 정지상은 낮은 농도와 작은 시료부피에서 수용성 시료로부터 분석물을 거의 완전하게 추출한다고 보고하였다. Fernandez²⁷은 85 μm PA 정지상과 100 μm PDMS 정지상의 수착 성능을 비교하였다. Simplicio²⁹은 유기인제 농약에 대하여 65 μm PDMS/DVB (divinylbenzene) 수착제가 가장 수착량이 많았지만 100 μm PDMS 수착제가 오래 사용할 수 있고 선형관계에서 농도범위가 더 넓었다고 보고하였다.

Jimenez²⁵은 85 μm PA 수착제, 100 μm PDMS 수착제와 7 μm PDMS 수착제의 수착성능을 비교하였는데 100 μm PDMS 수착제가 가장 수착량이 좋았다고 알렸다. 또한 Boyd-Boland²⁰은 85 μm PA 수착제, 15 μm PDMS 수착제, 55 μm PDMS 수착제의 성능을 비교하였다.

또한 Batle²³은 65 μm CW (carbowax)/DVB 수착제, 100 μm PDMS 수착제, 7 μm PDMS/DVB 수착제 그리고 85 μm PA 수착제를 비교하였다. Volante³¹은 60 μm CW/DVB 수착제와 100 μm PDMS 수착제를 비교하였고, Lambropoulou³²은 60 μm CW/DVB 수착제, 100 μm PDMS 수착제, 60 μm PDMS/DVB 수착제 그리고 85 μm PA 수착제를 비교하였다.

SPME기법을 이용한 대부분의 식품 중 잔류농약 분석에서 포도주 중 methyl isothiocyanate의 분석³⁴과 같은 몇 가지 경우를 제외하고는 대부분 100 μm PDMS 수착제를 사용하였다.^{19,34}

세 번째로 수용액 시료에서 휘젓기 (agitation)에 따른 수착제로의 농약들의 추출율을 조사하였다. 추출효율은 수용액에서 휘젓기 속도가 증가함에 따라 높아지므로, 휘젓기 속도를 일정하게 유지시키는 것이 중요하다.²⁹

네 번째로 수착온도에 따른 수착제의 추출율을 조사하였다.^{23,25,27,32} Jimenez²⁵은 parathion의 경우, 7 μm PDMS 수착제로 추출할 때 수착 온도는 30 $^{\circ}\text{C}$ 가 가장 좋았고 100 μm PDMS 수착제로 추출할 때는 수착 온도가 증가함에 따라 약간씩 증가한다고 하였다. 일반적으로 시료로부터 수착제로 잔류농약을 추출할 때는 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 이루어졌으나^{22,26,29,31,33}, 70 $^{\circ}\text{C}$ ²⁵나 75 $^{\circ}\text{C}$ ³²와 같은 높은 온도조건에서 수착시키기도 하였다. Batle²³은 수착온도의 영향은 분석물과 시료 용액의 성질에 따라 결정해야 한다고 보고하였다.

다섯 번째로 첨가되는 염의 종류 (Na_2HPO_4 , NH_4Cl ,

NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)에 따른 염 효과²³와 첨가되는 염의 양의 변화에 따른 농약의 추출율을 비교하였다.^{24,27} 정지상의 종류별로 용액시료의 pH가 중성에서 25% NaCl 를 첨가하였을 때의 염 효과를 조사하였는데 정지상의 종류와 무관하게 각 분석물마다 염의 첨가에 따라 염석 또는 염용 효과를 나타내었다.²⁰ Jimenez²⁵은 염용효과로서 수용액 시료에 NaCl 를 첨가하면 parathion과 endosulfan의 수착량이 감소된다고 하였다. Lambropoulou³²은 첨가시키는 Na_2SO_4 (w/v)의 양에 따른 염 효과를 조사하였다. 일반적으로 염을 첨가하여 이온세기가 변하면 농약의 물에 대한 용해도가 작아져 수착제로 추출율이 증가된다.

그 밖에도 수용액에서 분석물의 용해도가 감소하면 수착제로의 추출율이 증가하기 때문에 pH변화에 따른 추출율을 비교하였고,^{24,32} 유기용매의 영향을 조사하기도 하였다.²⁷

대부분 잔류농약 분석에서 사용된 SPME 방법은 농약들이 반휘발성 성질을 가지고 있어 상층부 추출법 (headspace extraction)보다 오히려 시료 용액에 수착제를 직접 담구어 추출하는 직접 담근질 방법이 주로 사용된다.

위에서 기술한 물중 농약들의 예비 실험을 통해 확립한 SPME 수착제에 의한 수착 조건들의 최적화를 바탕으로 실제 식품 중 잔류농약 분석에 적용하기 위한 실험으로서 시료 매트릭스 효과 (matrix effect)²⁷와 방해물의 영향을 최소화하기 위하여 시료에 물을 섞어 그의 몫함 비율에 따라 시료로부터 수착제로 농약들을 최대한으로 추출하기 위한 실험도 이루어졌다.^{28,29,32}

Simplicio²⁹에 의하면 음성 매트릭스 효과 (negative matrix effect)를 감소시키기 위해 유기인제 8종에 대하여 70%이상의 회수율 (순수한 물에서의 회수율과 비교해서)을 얻기 위해서는 시료를 50배 이상 물로 묽혀야 하고 100배까지 묽힐수록 회수율이 보다 증가하였다. Jimenez²⁵은 꿀 중 유기인제와 유기염소계 농약을 정량하기 위해 물로 5-50배로 묽혀 몫함비에 대한 영향을 조사하였다.

Louise¹⁹은 GC로 일정농도의 용액주입법과 SPME 주입법의 분석결과로 수용효과 (accumulation effect)또는 농축효과를 조사하였다. 농축효과는 농약의 성질에 따라 달라서 (수용액과 수착제 간의 분배계수) flusilazole은 농축비 (300배)가 다른 농약들에 비해 높아 1 ppb나 그 이하의 농도에서 SPME기법으로 충분히 검출되

있고, triadimenol에서는 SPME기법에 비해서 직접 용액 주입법에서 농축비(1.5배)가 높았다.

알코올성 시료의 경우, 시료 중 ethanol 함량의 변화에 따른 각 농약들에 대한 SPME 수착제에 의한 농약의 추출량의 영향을 조사하였다. 그 결과에서 ethanol의 농도가 증가할수록 대부분의 농약들은 순수한 물보다 ethanol에 잘 용해되므로 평형 분배계수가 ethanol 수용액에 유리하다.²³ 수용액 중 ethanol의 부피분율(ϕ)에 따른 용매의 극성지수(P_x)와 용질의 분배계수(K)간의 관계식을 유도하기도 하였다.¹⁹ 그 식은 다음과 같다.

$$P_x = \phi_{\text{ethanol}}P_{\text{ethanol}} + \phi_{\text{H}_2\text{O}}P_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$K_x/K_0 = 10^{(P_x - P_0)/2}$$

여기서 P_{ethanol} 과 $P_{\text{H}_2\text{O}}$ 는 각각 순수한 ethanol과 물의 극성지수(polarity index)이고 ϕ_{ethanol} 과 $\phi_{\text{H}_2\text{O}}$ 는 각각 ethanol과 물의 분율이며 P_x 와 P_0 는 각각 수용성 ethanol 혼합용매의 극성지수와 순수한 물에서 극성지수이고 K_x 와 K_0 는 각각 x% ethanol를 포함한 수용액과 순수한 물에서 용질의 분배계수를 말한다.

Volante 등²²은 감자와 꿀 중 각각 chlorpropham과 amitraz를 분석하는 연구에서 시료와 수착제간에 농약을 전달할 수 있는 매체인 '전이 매체'로서 추출용매와 시료, 그리고 수착제와 함께 3-상(phase)에서 분배계수를 연구하였다. 뿐만 아니라 Weiqi Chen 등²⁸은 2-상과 3-상 성분계에서 흡착비(f)와 분배계수(K)로부터 농약의 추출량을 계산할 수 있는 관계식을 유도하였고, 그 관계식은 다음과 같다.

$$\frac{n_s'}{n_s} \approx \frac{f}{1+f} + \frac{1}{K_{wv}(1+f)} \approx \frac{K_{wv}f+1}{K_{wv}(1+f)}$$

여기서 n_s'/n_s 는 SPME에 의한 농약의 회수율의 역수이고, K_{wv} 는 물상과 식물 시료간의 분배계수이며, f 는 물/식물시료 간의 부피비이다. 또한 $\log K_{ow}$ (octanol/물 간의 분배계수) 대 $\log K_{wv}$ 관계식을 유도하여 분자 구조상으로 같은 계열 농약들의 시료와 물간의 분배계수(K_{wv})를 옥탄올/물의 분배계수(K_{ow})로부터 쉽게 계산할 수 있도록 하였다.

Volante 등³¹은 식품 중 잔류농약을 SPME기법을 통해 분석하는데 있어서 가장 효과적으로 추출하기 위한

방법을 연구하였으며 공인된 다성분 잔류농약 추출방법과 비교하고 기준 표준물질(reference standard material)을 구입하여 SPME기법에 의한 잔류 농약 분석법의 타당성을 입증하였다.

4. 장래 전망¹⁸

SPME는 용매불사용 시료 제조 분야에서 새로운 방법이다. 현재까지 이러한 기법의 유용성은 GC와 HPLC와 연계해서 환경시료들을 포함한 다양한 시료 중 유기물들의 분석에서 사용되어 왔고 보다 광범위하게 사용될 것으로 전망된다.

이온 교환 섬유가 사용된다면 이 기법은 이온성 유기물들이나 각종 무기물 분석에 활용할 수 있고 SPME를 직접 원자흡광, 유도결합 플라즈마, 스파크 또는 글로우 방전기기와 결합시킨다면, SPME의 활용은 많은 화합물에도 확대시킬 수 있다. 바꾸니 분자(caging molecule)처럼 분자 인식 능력이 있는 수착 섬유가 개발된다면 선택성 추출이 가능할 수 있다.

SPME의 원통형 형태는 질량 분석계(MS)에 시료 도입의 장치로서 적당하다. 수착 섬유에서 분석물을 매우 빠르게 탈착시켜 분석물들을 이온화함(ionization chamber)에 신속히 주입하고, 매우 좁은 띠로 만들어 진다. 이온 포집 질량 분석계(ITMS)를 SPME와 연결시키면 0.5초 이하의 좁은 봉우리의 폭을 얻을 수 있다. 좁은 폭의 봉우리는 그의 높이를 증가시키고 신호/잡음(S/N)을 향상시키므로 결과적으로 S/N가 100에서 0.15 pg의 검출한계까지 얻어진다. SPME/MS는 약물에서 femtogram 수준의 미량 대상 분석물들을 검출해 낼 수 있다.

Bioaffinity 수착제로 된 SPME는 직접 생체 유체 또는 단세포에서 그들을 HPLC 용매나 모세관 전기이동용 완충용액 또는 직접 질량 분석계로 탈착시켜 분석할 수 있다.

새로운 수착제의 개발은 시료조제를 위한 선도적인 기법으로써 SPME 기법을 활용하는데 매우 중요하다. 열적으로 안정하고 극성 수착제들의 개발은 극성 혼합물들의 정량에 매우 중요하다. 수착제는 SPME의 핵심이기 때문에 이 분야의 발전은 SPME의 활용을 크게 확장시킬 것이다.

Table 4. Applications of SPME to determination of pesticides in foodstuff samples

Pesticide Group	Matrix	Fiber Type	Mode of Application	Chromatographic Determination	Procedure	Detection Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Precision (%)	Calibration Method	Ref.
N-containing herbicides	Wine	95 μm PA	Direct immersion (manual)	GC-MS	4 mL sample extracted under stirring for 50 min; desorption at 230 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min.	0.00001-0.015	2-22		30
				GC-NPD		0.01-6	7-22		
				GC-FID		0.4-19	-		
Organophosphorot hioates Chlorohydrocarbons, Benzylate, Sulfamid, Acylamide, Phthalimide, Dicarboxyimides, Triazoles	Wine, Alcoholic solutions	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-MS	3 mL of sample-water (finally 10% alcoholic solution or wine) extracted under stirring for 30 min; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min.	-	-	-	19
Organochlorine pesticides, N-Containing herbicides, Organophosphorus pesticides	Orange juice	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-MS	4 mL of sample-water extracted under stirring for 50 min; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min.	0.001-0.060	2-37	Standard addition, external calibration method	20
Dicarboxyimide	Wine	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-MS	3 mL of sample extracted under stirring for 30 min; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min.	0.1	3.1-10.0	Standard addition method	21
Methylisothiocyanate	Wine	65 μm CW/DVB	Headspace	GC-FID GC-NPD	5 mL wine added with NaCl extracted under stirring for 30 min; desorption at 230 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min.			Standard addition method	34
Organochlorine pesticides	Honey	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-ECD	3 mL of honey-water solution (1:5) added with NaCl extracted under stirring for 60 min at 70 $^{\circ}\text{C}$; desorption at 260 $^{\circ}\text{C}$ for 4 min.	0.1-30	8-16	-	25
		7 μm PDMS				60	2.5		
		85 μm PA				60	7-24		
Carbamate, Amidine	Potatoes Honey	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-MS	1 g of sample with added 9 mL water; 10 mL of solution extracted under stirring for 50 min at 25 $^{\circ}\text{C}$; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 3-5 min.	10	-	External calibration method	22
Organophosphorus pesticides	Food plant	100 μm PDMS	Headspace	GC-FPD	5 g of food-water paste (1:3); extracted under stirring for 90 min; desorption at 270 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min.	4.7-75	1.5-19.8		28
Organophosphorus pesticides	Pear, fruits juice	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-FPD	3 mL of sample-water (1:100) extracted under stirring for 20 min at 25 $^{\circ}\text{C}$; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 2 min.	0.003-0.014	0.8-3.4	Standard addition method	29

(Table 4- continued)

Pesticide Group	Matrix	Fiber Type	Mode of Application	Chromatographic Determination	Procedure	Detection Limit ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Precision (%)	Calibration Method	Ref.
Organophosphorus pesticide, Organochlorine pesticide, Benzilate, Azole, Dicarboximide	Food simulants (ethanol-water mixtures)	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-MS	-	0.02-0.04	< 20	Internal standard method	23
Organochlorine pesticides	Chinese herbal formulations	100 μm PDMS		GC-MS	10 g sample extracted with n-hexane-acetone (1:1) for 3 hrs; added with NaCl extracted under stirring for 90 min; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min.	0.03-0.9	3-21	-	24
Organophosphate, Pyrethroid pesticides	Vegetables (potatoes, legumes, drupe)	100 μm PDMS 60 μm CW/DVB	Direct immersion (manual)	GC-ECD, GC-NPD, GC-MSD	10 g sample extracted with acetone; 100 mL of extract-water (1:9) extracted under stirring for 50 min; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min.	0.005-1.0 0.010-0.55 -	- - -	Internal standard method	31
Dicarboximides, Pyrimidinyl carbinol, N-trihalomethylthio Azole, Benzilate Organophosphate	Must, Wine	100 μm PDMS	Direct immersion (manual), Headspace	GC-ECD	3 mL of sample-water (1:50) extracted under stirring for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$; desorption at 250 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min.	11	< 20	-	26
Organophosphorus pesticides	Honeybees	100 μm PDMS	Direct immersion (manual)	GC-NPD	10 g of honeybees diluted with 50 mL acetone-water (1:1, v/v); 3 mL solution (5% acetone) extracted under stirring for 45 min.	1-10	-	Standard addition method	27
Carbamate, Benzilate Azole pyrimidinyl carbinol	Strawberry	60 μm PDMS/ DVB	Direct immersion (manual)	HPLC/DAD	4 mL strawberry extracted under stirring for 45 min at 25 $^{\circ}\text{C}$.	13-22	3-7.3	-	33
Organophosphorus pesticides	Strawberry, Cherry juice	100 μm PDMS	Headspace	GC-FID GC-MSD	10 mL sample extracted under stirring for 45 min at 75 $^{\circ}\text{C}$.	0.025-0.050	< 20	-	32

참고 문헌

1. Z. Zhang, M. J. Yang and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **66**, 844A-853A(1994).
2. S. A. Scheppers, "Solid phase microextraction-A practical Guide", iii, S. A. Schseppers, Ed, Marcell Dekker, New York 1999.
3. Lloyd R. Snyder, *Anal. Chem.*, **72**, 412A-420A(2000).
4. J. Pawliszyn, *TrAC*, **14**, 113-122(1995).
5. G. Grob, and F. J. Zucher, *J. Chromatogr. A*, **117**, 285-294(1976).
6. S. B. Hawthorne, *Anal. Chem.*, **62**, 633A-642A(1990).
7. K. F. Pratt and J. Pawlyszin, *Anal. Chem.*, **64**, 2101-2106(1992).
8. D. C. Harris, "Quantitative Chemical Analysis" 5th Ed., 694, W. H. Freeman and Company, New York, 1999.
9. R. Eisert and K. Levsen, *J. Chromatogr. A*, **733**, 143-157(1996).
10. J. R. Dean, G. Wade and J. J. Barnabas, *J. Chromatogr. A*, **733**, 295-325(1996).
11. J. Beltran, F. J. Lopez and F. Hernandez, *J. Chromatogr. A*, **855**, 389-404(2000).
12. H. Kataoka, H. L. Lord and J. Pawlizyn, *J. Chromatogr. A*, **880**, 35-62(2000).
13. J. Pawlizyn(Ed), "Applications of Solid Phase Microextraction", Royal Society of Chemistry, Cambridge 1999.
14. J. Pawliszyn, "Solid phase microextraction - Theory and Practice", 37, Wiley-VCH, New York, 1997.
15. D. Louch, S. Moltagh and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **64**, 1187-1199(1992).
16. Z. Zhang and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **65**, 1843-1852(1993).
17. CL. Arthur, *Anal. Chem.*, **62**, 2145-2148(1990).
18. Z. Zhang, MJ. Yang and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, **66**, 844-853 (1994).
19. U. Louise and M. Michel, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3871-3877(1996).
20. A. A. Boyd-Boland, S. Magdie, B. Janusz and J. Pawlisyn., *Analyst*, **121**, 929-938(1996).
21. L. Urruty, M. Montury, M. Braci, J. Fournier and J. Dourmel, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1519-1522(1997).
22. M. Volante, M. Cattano, M. Bianchin and G. Zoccola, *J. Environ. Sci. Health*, **B33**, 279-292(1998).
23. R. Batle, C. Sanchez and C. Nerin, *Anal. Chem.*, **71**, 2417-2422(1999).
24. Bao-Huey Hwang and Maw-Rong Lee, *J. Chromatogr. A*, **898**, 245-256(2000).
25. J. J. Jimenez, J. L. Bernal, M. T. del Nozal, M. T. Martin, and A. L. Mayoga, *J. Chromatogr. A*, **829**, 269-277(1998).
26. Manuela Correia, Cristina Delerue-Matos and Arminda Alves, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 647-651(2001).
27. M. Fernandez, C. Padron, L. Marconi, S. Ghini, R. Colombo, A. G. Sabatini and S. Girotti, *J. Chromatogr. A*, **922**, 257-265(2001).
28. Weiqi Chen, Ka-fai Poon and Michael H. W. Lam, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3816-3820(1998).
29. Ana Luisa Simplicio and Luis Vilas Boas, *J. Chromatogr. A*, **833**, 35-42(1999).
30. A. A. Boyd-Boland, *J. Chromatogr. A*, **704**, 163-172(1995).
31. Marco Volante, Mirella Pontello, Laura Valoti, Manuela Cattaneo, Mascia Bianchi and Luisa Colzani, *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 618-636(2000).
32. D. A. Lambropoulou and T. A. Albanis, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3359-3365(2002).
33. Clara Falqui-Cao, Zhi Wang, Louise Urruty, Jean-Jacques Pommier and Michel Montury, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5092-5097(2001).
34. G. Nicola and R. Roberto, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3092-3094(1997).