

HF-LPME를 이용한 수용액 시료중의 카페인 분석

인치연¹ · 김택제¹ · 명승운^{*}

경기대학교 화학과, ¹(주)산청 기술연구소
(2008. 1. 23. 접수. 2008. 3. 17. 승인)

Analysis of caffeine in aqueous sample by hollow fiber-liquid microextraction (HF-LPME)

Chi-Yeon In¹, Taek-Jae Kim¹ and Seung-Woon Myung^{*}

Department of Chemistry, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea

¹Sancheong Technical Research Institute, Yongin 449-823, Korea

(Received January 23, 2008; Accepted March 17, 2008)

요 약: 속빈 섬유-액상 미량추출법(hollow fiber-liquid phase microextraction, HF-LPME)과 기체 크로마토그래프/질소-인 검출기(GC-NPD)를 사용하여 사람의 뇨와 여러 가지 음료 중에서 극미량의 카페인을 분석하는 방법을 확립하였다. 수용액 시료로부터 카페인의 양을 측정하기 위해서 속빈 섬유의 길이, 추출용매의 종류, 교반효과, pH 및 염석효과 등 여러 가지 실험적인 파라미터를 변화시켜서 최적의 조건을 확립하고자 하였다. 검정곡선의 회귀계수(r^2)는 0.9994이상이었으며, 평균 상대 회수율은 102%($n=3$)이었으며, 기기검출한계는 2.5 ng/mL, 정량한계는 10 ng/mL이었다. 확립된 HF-LPME 방법은 생물학적 시료, 음식물, 환경시료 중에서 카페인의 농도를 측정하기에 편리하고 정확한 방법이 될 것이다.

Abstract: A method for the determination of trace amount of caffeine in urine and various drink samples using hollow fiber-liquid phase microextraction (HF-LPME) and capillary gas chromatograph/nitrogen phosphorus detector (GC/NPD) has been established. HF-LPME method has been optimized with respect to several experimental parameters including the effects of the hollow fiber length, extraction solvent, stirring mode, pH and salt concentration for the determination of caffeine from aqueous samples. The correlation coefficient of calibration curve for caffeine was 0.9994. The average recovery was 102%($n=3$). The established method is feasible for the determination of trace amounts of caffeine in several aqueous sample. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) have been found to be 2.5 and 10 ng/mL, respectively. The established HF-LPME method for the analysis of caffeine from aqueous sample can be used for the determination of biological, food and environmental samples.

Key words : HF-LPME, GC-NPD, Caffeine

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)31-249-9647 Fax : +82-(0)31-249-9647

E-mail : swmyung@kgu.ac.kr

1. 서 론

시료의 분석 과정은 시료 채취, 시료 전처리, 분리, 정성·정량 분석, 통계적 평가 및 검토로 구분될 수 있다. 그리고 각각의 단계는 우리가 원하는 정확한 분석물의 결과를 얻기 위한 중요한 단계라 할 수 있다. 그 중 시료의 전처리 과정은 미량분석에서 시료중의 분석물질에 대한 정확한 분석결과를 얻기 위해 가장 많은 시간과 노력이 필요로 하는 단계 중의 하나이다. 1991년 Majors의 조사 보고서¹에 따르면 전체 분석과정 중 시료 처리 과정이 총 분석시간의 61% 정도가 소요된다고 알려져 있다.

시료의 전처리 목적은 분석물질과 함께 존재하는 방해물질을 제거함으로써 분석물의 선택성을 향상시키고 분석물질을 농축함으로써 감도를 향상시키며, 분리나 검출에 적합한 분석물질로 전환시키는데 있다.

시료의 전처리 단계에는 추출, 분리에 의한 정제 및 농축 과정이 있다. 이 전처리 단계중의 하나인 추출은 일반적으로 사용하고 있는 방법 중의 하나이다. 추출법 중 가장 전통적인 추출 방법은 액체-액체 추출법(Liquid-Liquid Extraction, LLE)^{2,3}인데 이는 쉬이지 않는 두 가지 용매 층 간에 시료를 분배하여 방해물질들과 분석물질들을 분리시키는 기법이다. 그러나 이 추출법은 전처리 과정에 있어서 많은 양의 고순도 추출(유기) 용매를 필요로 하고 여러 번 반복해서 추출하여야 한다. 따라서 사용되는 많은 유기 용매는 인체에 유해하고 환경에 유해한 영향을 끼치며 특히 미량 분석을 위해서는 사용된 용매를 농축하여야 하므로 추출시간 또한 오래 걸린다는 단점이 있다.^{4,6}

최근 분석화학의 동향은 시료 전처리에 대한 간결성과 소형화이고, 유기 용매를 사용을 하지 않거나 극소량을 사용하는 추세이다.^{7,8} 이들 추출방법은 기체상에 의한 추출법, 수착제 추출법(sorbent extraction), 막 추출법(membrane extraction) 등으로 분류할 수 있으며, 그들 중에서 수착제 추출법으로 분류되는 고체상 미량 추출법(solid phase micro-extraction, SPME)⁹과 기계 구성 원리상에 따라 막 추출법과 방울 추출법으로 분류 되는 액체상 미량 추출법(liquid phase micro-extraction, LPME)이 일반적으로 사용되고 있는 방법이다.

고체상 미량 추출법(SPME)은 장치가 간단하고 시료 채취 현장에서 직접 용용 실리카 섬유에 분석물질을 흡착시킴으로써 추출이 가능하고 유기 용매가 필요 없으므로 친 환경적이며, 다른 절차없이 직접 기체

나 액체 크로마토그래프에 주입할 수 있어 조작 등의 방법이 간단하다. 그러나 용용 실리카 섬유의 수명과 선형 범위가 제한적이며 부러지기 쉽고, 비교적 섬유와 섬유 홀더가 고가라는 단점이 있다.^{10,11}

액체상 미량 추출법(LPME)은 SPME가 가지고 있는 장치와 조작 과정이 간단하고 분석 시료 양과 수착제의 소형화라는 장점과 LLE의 추출 원리를 결합시킨 최근에 개발된 추출 기법이다.

액체상 미량 추출법(LPME)은 추출 조작에 따라 동적인 방법과 정적인 방법으로 나눌 수 있다.¹² 동적인(dynamic) 방법은 미량 주사기에 추출용매 수 μL 정도를 취한 후 주사기의 플런저를 움직이어서 일정량의 시료를 주사기 내부로 끌어들이었다가 다시 내보내는 동작을 반복시켜 주사기 내부에서 유기 추출용매와 수용액 시료와의 사이에서 분석물질이 분배가 일어나게 함으로써 추출하는 방법이다. 정적인(static) 방법은 미량 주사기에 일정량의 추출용매를 취한 후 주사기 바늘을 시료에 넣고, 주사기의 플런저를 천천히 밀어서 추출용매가 주사기 바늘의 끝에 방울 형태로 맺히게 하여 시료 용액과 접촉시켜 그 용매방울을 통해 분석물질이 추출되게 하는 기법이다. 동적인 방법은 주사기의 반복 동작에 대한 속도 및 정확성에 대한 어려움이 있고, 정적인 방법은 주사기 바늘 끝에 달린 추출용매를 취급하기가 어렵다는 단점을 가지고 있다.¹³ 이런 단점에 대한 해결책으로 동적인 방법은 주사기의 반복동작을 자동화하는 장치^{14,15}를 고안하면 되지만 장치가 고가라는 또 다른 단점을 가지고 있다. 정적인 방법의 단점을 보완·개량한 방법이 추출용매를 고정할 수 있는 지름이 작은 동공을 가지고 있는 속빈 섬유(Hollow-Fiber, HF)를 이용하는 방법^{16,17}이다. 속빈 섬유를 이용한 추출 기법은 추출용액이 시료 용액과 직접적으로 접촉하지 않기 때문에 시료 용액의 교반이나 진동에 의한 추출용액의 손실이 극히 적고 추출 장치 또한 저가이며 실험실에서 직접 제작할 수 있다. 따라서 HF를 이용한 액체상 미량 추출법은 여러 액체상 미량 추출법 중에 이용가치가 높은 추출법이라 할 수 있다.

Ugland 등¹⁸은 U-형 LPME를 이용하여 생체시료 중에서 benzodiazepines을 분석하였고, Chiang 등¹⁹은 동적인 LPME를 이용하여 수용액 중에서 haloethers를 분석하였다. 같은 기법을 이용하여 Huang 등²⁰은 녹차 잎에서 organochlorine pesticides를 분석하였고, Lai 등²¹은 HF-LPME를 이용하여 물과 소변 중에서 dichlorophenol 이성질체를 분석하였다. 그리고 Hou 등¹²도 HF-LPME

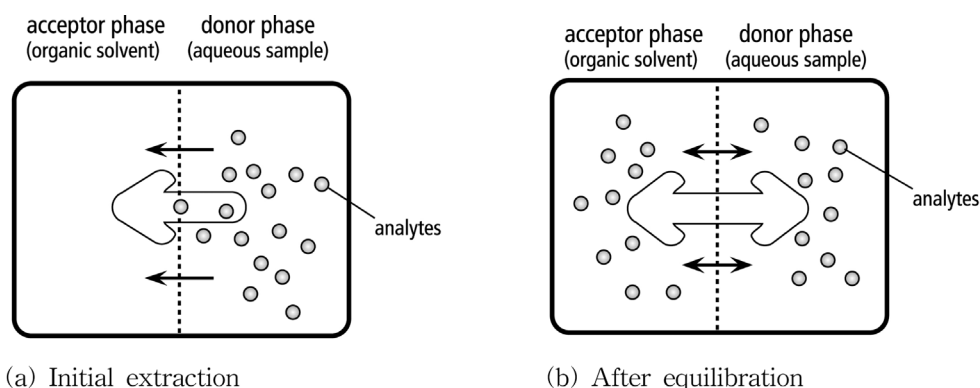


Fig. 1. Two phase LPME; (a) Initial extraction, (b) After equilibration.

를 이용하여 토양 중에서 농약 등을 분석하였다. 이처럼 LPME는 HF의 형태와 실린지 플런저의 동작등을 이용하여 다양한 시료 중에서 원하는 분석물질을 정량할 수 있는 유용한 추출 기법이라 할 수 있다.

본 연구에서는 속빈 섬유(HF)를 이용한 액체상 미량 추출법(LPME)의 활용을 위한 추출장치의 구성 방법에 대해 실험의 초점을 맞추었고 분석물질은 식물성 알칼로이드에 속하는 흥분제의 일종인 카페인(caffeine)을 사용하였다. 동적인 LPME나 U형 LPME는 장치 구상의 문제와 추출 후 유기 용매의 수집이 까다롭기 때문에 실험자가 가장 간편하면서 보다 쉽고 분석물질을 추출할 수 있는 방법으로 두 상(two phase)을 이용한 막대형 LPME를 사용하였다.

그리고 카페인의 추출효율을 높일 수 있는 여러 가지 추출 실험 요인(추출 용매의 종류와 양, 속빈 섬유의 길이와 모양, 교반에 의한 추출 평형 시간)들을 변화시키면서 분석을 위한 최적 추출 조건을 확립하고자 하였으며, 확립된 추출방법을 이용하여 실제 수용액 시료(사람의 뇨, 커피, 녹차, 자양강장제)에 적용하여 기체 크로마토그래프(GC)-질소·인 검출기(nitrogen-phosphorus detector)를 사용하여 카페인을 분석하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 추출 장치 및 기구

끝이 봉합된 막대 모양의 HF를 그림(Fig. 2)과 같이 수집을 위한 가이드 끝에 장착하고 HF 관내에 받게 용액을 채운 후 추출을 한다. 추출 후에 미량 실린지를 수집을 위한 가이드를 통해 HF의 하단까지 주입하여 받게 용액을 취하여 분석기에 주입하였다.

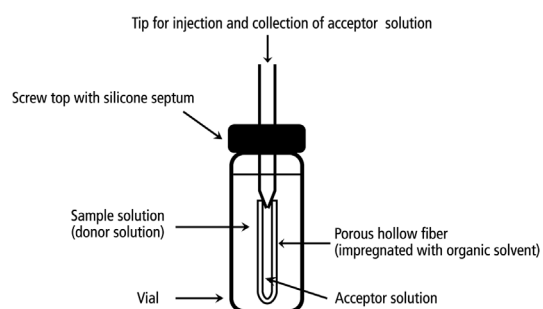


Fig. 2. Configuration of Rod-like HF-LPME.

사용된 hollow-fiber는 polypropylene 속빈 섬유로써 안지름이 600 μm , 막두께가 200 μm (Accurel Q3/2 Membrana, Wuppertal, Germany)이었다. HF를 지지해 주고 미량 실린지의 시료 채취를 원활하게 도와주도록 의료용 주사기용 바늘(21G 1 1/4 TW, 0.8 \times 32 mm, (주)아이템, 한국)과 격막(septa)(Advanced Green Septa, Agilent, USA)이 사용되었다. 추출 후에 시료를 취하기 위해서는 GC용 미량 실린지(10 μL , SGE, Australia)가 사용되었으며, 혼탁한 시료(커피)중 입자들을 제거하기 위하여 3 mL 의료용 주사기와 바늘 지름이 25 mm이며 동공 0.2 μm 인 실린지용 거르개(GHP membrane, Life Science, USA)를 사용하였다.

2.2. 시약 및 표준 용액

표준물질은 순도 99%의 카페인(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하였고, 톨루엔, 클로로포름, 에틸 아세테이트(EA), 헥세인, tetrahydrofuran(THF), dichloromethane(DCM)과 같은 추출용매는 HPLC급(J.T. Baker, NJ, USA)을 사용하였다. 염화나트륨은 시약급(덕산, EP, 순도. 99.0% 이상)을 사용하였으며, 염산(덕산, 일

급시약, 순도. 35.0% 이상) 및 수산화나트륨(대정화금, EP, 순도. 98.0%이상)은 5 M로 묽혀서 사용하였다. 증류수는 증류수 제조장치(창신과학기술제작소, C-DIS1형)를 이용하여 직접 제조하여 사용하였다.

메탄올에 카페인을 녹여 5050 µg/mL이 되도록 표준용액을 제조하였다. 표준용액을 증류수에 spike 시켜서 1010 µg/mL가 되게 한 후 또 다시 증류수로 희석시켜 101 µg/mL, 1.01 µg/mL가 되도록 제조하였다. 제조 후 표준 용액은 약 4로 냉장 보관하여 사용하였다.

2.3. 분석장비

카페인 분석을 위한 기체 크로마토그래프(GC)/질소-인 검출기(nitrogen phosphorus detector, NPD)는 도남인스트루먼트(한국)의 DS 6200형 및 TID-001형을 사용하였고 분석 자료를 얻기 위한 자료 장치는 DsChrom 2000(도남인스트루먼트, 한국)을 사용하였다. 모세관 컬럼은 SGE사의(Australia)의 BP-5(cross-linked 5% phenyl polydimethylsiloxane) 길이는 17 m, 안지름은 0.32 mm, 정지상 두께는 1.0 µm인 것을 사용하였다. 운반 기체와 보충 기체는 99.999%의 고순도 헬륨(He)을 VICI사(USA)의 헬륨 정화장치(Helium Purifier, HP2)에 통과시킨 후 사용하였고 연료 기체는 99.999%의 수소와 공기를 사용하였다.

분석 시료의 교반 및 HF의 봉합을 위한 가열판과 젓개는 Corning사(USA)의 PC-620형을 이용하였다. 녹차 및 자양강장제의 부유물의 침전을 위한 원심분리기는 한일 유니온사(한국)의 55R형을 사용하였고, HF의 유기 잔유물 제거를 위한 초음파 세척기는 L&R사(USA)의 S1000을 사용하였다.

GC/NPD 분석조건은 다음과 같다. 운반기체인 헬륨의 유속은 1.0 mL/min로 조절하였고 분할비는 3:1에서 분석하였다. 보충 기체는 운반기체를 포함하여 10.0 mL/min이 되도록 하였고 연료 기체로서 수소는

4 mL/min, 공기는 60 mL/min으로 조절하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 최초 100°C에서 1분간 유지시킨 후 50°C/min로 270°C까지 승온시켰으며, 다시 10°C/min로 300°C까지 승온시킨 후 300°C에 도달하면 1분간 온도를 유지시켜줌으로써 총 분석시간을 8.4분으로 하였다. 이때 시료 주입구와 검출기의 온도는 각각 250°C와 280°C이었으며 Table 1에 요약하였다.

2.4. 분석 절차

안지름이 600°C이고 막 두께가 200°C인 일회 분석용 속빈 섬유(HF)를 3 가량 절단한 후 HF내 유기물질의 제거를 위해 HPLC급 아세톤으로 약 5분간 초음파기로 세척 후 건조시킨다. 건조 후에 한쪽 끝을 약 300°C 정도로 설정된 가열판을 이용하여 용융·봉합시킨 후 사용하였다. 추출을 위한 받게 용액은 톨루엔 등을 사용하였으며 이때 HF 내에 있는 유기 용매(받게 용매)의 부피는 여러 가지 조건을 고려하여(시료의 깊이와 HF 길이 등) 7 µL로 일정하게 취하여 실험하였다.

추출 세부 단계는 다음과 같다. i) 적절한 길이로 조절된 의료용 주사기 바늘에 HF를 연결시킨 후 의료용 주사기 바늘에 먼저 미량 실린지의 끝(tip)을 끼운다. ii) HF가 부착된 미량 실린지를 유기용매가 채워진 비커에 서서히 담그면 HF 내의 동공에 유기 용매(받게 용매)가 침투된다. 이때 HF내에 하단부터 서서히 용매가 채워지는 양을 눈으로 확인할 수 있다. iii) HF내에 추출용 유기 용매가 모두 차면 곧바로 HF를 시료 vial(시료 용액 4.0 mL)에 담겨서 추출을 시작한다. 이때 빠른 추출을 위해서 1100 rpm 정도로 조절된 테플론 자석 젓개(3×7 mm)를 이용하여 시료를 교반한다. iv) 추출이 완료되면 의료용 주사기 바늘 안에 미량 실린지를 삽입하여 받게 용액(유기 용매)을 채취한 뒤 GC에 곧바로 주입하여 분석하였다.

Table 1. Operating parameters of GC/NPD

Column : BP-5(cross-linked 5% phenyl polydimethylsiloxane)
17 m × 0.32 mm × 1.0 µm
Carrier Gas : 1.0 mL/min (He)
Fuel Gas : 4 mL/min (H ₂), 60 mL/min(Air)
Make-up Gas : 9 mL/min (He)
Injection mode : Split ratio (3:1)
Injector temp. : 250°C
Detector Temp. : 280°C
Oven Temp. :
1 min at 100°C, up to 270°C at 50°C/min, 300°C at 10°C/min, and finally 1 min at 300°C

3. 결과 및 고찰

3.1. HF-LPME 인자들의 최적화

추출용매, 추출 시간, 교반 효과, pH, 염석효과 등에 대한 조건들을 변화시켜 가면서 얻은 카페인의 최적 추출조건은 다음과 같다.

3.1.1. 추출용매

수용액 시료에 함유된 카페인을 유기 용매로 효과적으로 추출하기 위해서는 다음과 같은 조건을 만족

해야 한다. 첫째는 물과 섞이지 않고 물에 대해 용해도가 낮아야 하고, 둘째는 분석하고자 하는 물질에 대해 용해도가 높아야 하며, 셋째는 속빈 섬유(hollow fiber)에 잘 고정되어 오래 머무를 수 있어야 한다. 또한 원활한 분석을 위해서 분석기기 사용에 적합해야 한다.

수용액중의 카페인 함량 측정을 최적화하기 위한 조건을 찾기 위하여 증류수에서 카페인의 농도가 10 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 하였고 시료의 부피는 4 mL로 하였다. 최적의 추출 용매(받게용매)를 선정하기 위하여 물과 섞이지 않는 유기 용매 중에서 일반적인 추출 용매로 사용되는 chloroform, ethyl acetate(EA), dichloromethane(DCM), toluene, tetrahydrofuran(THF), hexane 등 용매의 극성이 큰 것부터 작은 것까지 적절하게 선정하여 추출률을 비교하였다. 이때의 HF의 길이는 3.5 cm, 추출시간은 5분이었다.

그 결과 사용된 추출용매 중에서 클로로포름이 가장 높은 추출률을 나타내었지만 반복 시험시 상대표준편차(RSD)가 22.5%로 적합하지 못하였고, 톨루엔

을 제외한 나머지 유기 용매들은 HF내로 유기 용매를 넣은 과정에서 HF내 유기 용매의 고정 여부를 확인하기가 어려웠으며, 추출 시간이 길어질수록 추출과정에서 유기 용매의 손실이 톨루엔에 비하여 크므로 카페인 추출을 위한 유기 용매는 톨루엔으로 결정하였다.

3.1.2. 추출 시간 및 교반

HF-LPME에서의 추출은 분석물질이 수용액 상으로부터 유기 용매 상으로 이동되는 양에 의존된다. 그리고 이동되는 양은 시간에 의존하게 되므로 일반적으로 추출량은 추출 시간이 길어질수록 증가(평형 도달 시간까지)하게 된다. 그러나 시간이 길어지면 추출 과

Table 2. Extraction conditions for HF-LPME

Parameters	Conditions
Organic solvent	Toluene
Hollow fiber length	2.5 cm
Exposure time	
with agitation	0.5, 1, 2, 3, 4, 5 min
without agitation	3, 5, 10, 15, 20 min

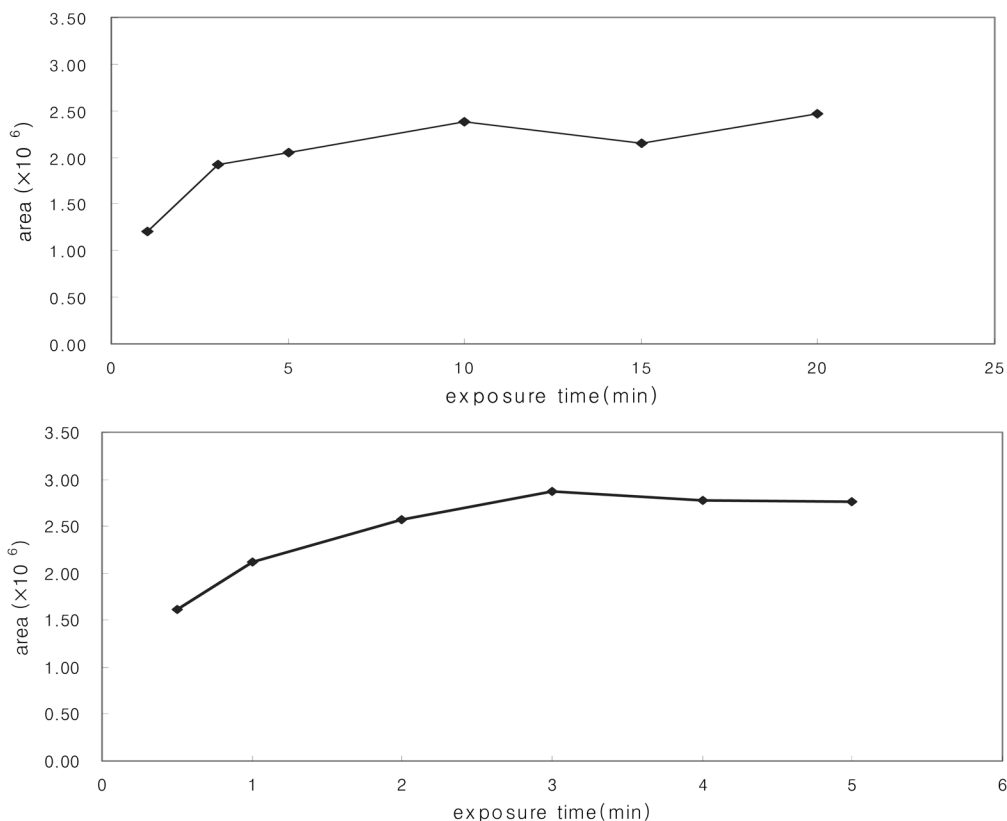


Fig. 3. Effect of exposure time without agitation (upper layer) and with agitation (lower layer).

정에서 용매의 손실이 일어날 수 있으므로 적절한 추출 시간을 선정하는 것이 정확한 분석을 위해서 중요하다. 따라서 추출 시간은 분석물질과 유기 용매간의 농도 평형이 이루어져서 분석하고자 하는 물질이 가장 좋은 감도를 나타낼 때를 선정하여야 한다.

또한 분석 물질의 유기 용매로의 이동은 시료용액을 교반함으로써 그 효과를 극대화시킬 수 있으며 분석 물질과 유기 용매간의 농도 평형 시간이 단축되게 된다.

시료의 부피 4 mL, 추출용매는 톨루엔, HF의 길이는 2.5 cm에서 교반을 했을 때와 교반을 하지 않았을 경우에 추출 평형 도달시간을 선정하기 위해 Table 2와 같은 조건으로 실험하였다.

교반을 하지 않았을 경우에 10분까지는 추출량이 증가하다가 그 이후에는 변화가 거의 일어나지 않고 평형에 도달하였으나(Fig. 3), 자석젓개를 사용하여 교반을 했을 경우에는 3분까지는 추출량이 증가하다가

그 이후에는 변화가 거의 일어나지 않고 평형에 도달하였다(Fig. 3). 따라서 적절한 추출시간(노출시간)을 고려해 최적의 추출 시간을 3.5분으로 설정하였다.

3.1.3. pH의 영향

pH를 변화시킴으로써 분석물질의 이온화 형태를 변화시킬 수 있고 물에 대한 용해도 및 추출정도에 영향을 주게 된다. 따라서 pH는 LPME 추출에 있어 중요한 하나의 인자이다. 시료의 부피 4 mL, 추출용매는 톨루엔, HF의 길이는 2.5 cm, 추출시간은 3.5분에서 pH의 조절을 위해 5 M 염산과 5 M 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH를 조절(2, 4, 7, 9, 10, 11, 12)하여 추출물을 비교해 보았다.

그 결과 pH가 10에서 가장 높은 추출률을 나타내었다(Fig. 4). 두 상(two phase)을 이용한 LPME에서 중성물질은 유기 용매에 용해가 잘되고, 하전된 물질은 수용액에 잘 용해되기 때문에 pK_a 는 10.4인 카페

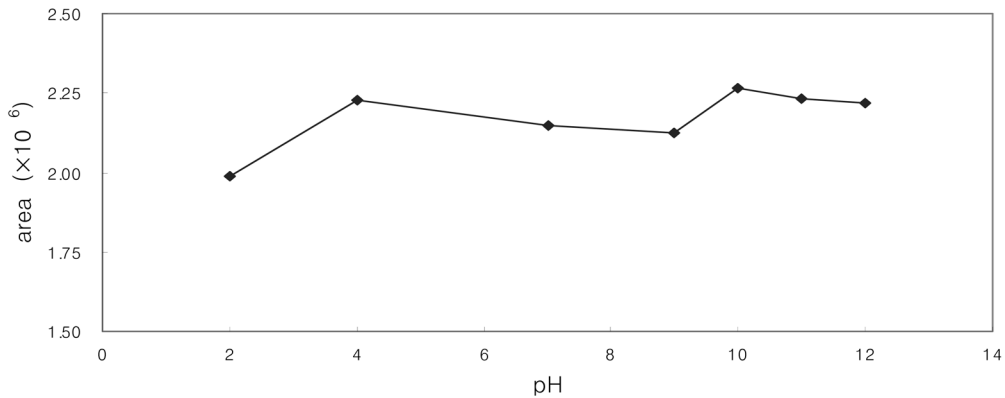


Fig. 4. Effect of pH changes.

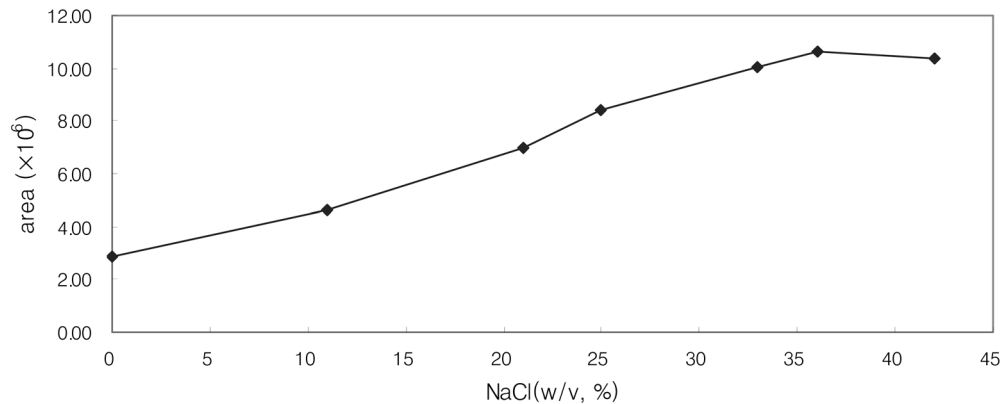


Fig. 5. Effect of salting-out on extracted amount of caffeine.

인은 염기성 조건에서 중성상태로 존재하게 되므로 유기용매 층으로 분석물질을 추출하기 위해서는 이온 상태가 아닌 중성상태로 pH를 맞추어야 하였다.

3.1.4. 염석 효과

추출에 대한 염석효과를 보기위해서 증류수에 카페인의 농도가 10 µg/mL이 되도록 하였고 시료의 부피는 4 mL로 한 후 시료 중에서 염화나트륨의 농도가 0~43%(0, 11, 21, 25, 33, 36, 42 w/v%)가 되도록 첨가하였다. 이때 사용된 용매는 톨루엔이었으며, HF의 길이는 2.5 cm, 추출시간은 3.5분이었다.

실험 결과 카페인의 경우 NaCl이 포화되는 농도(42 w/v%)에서 가장 높은 추출률을 나타내었다(Fig. 5).

분석 시료의 이온 세기는 LLE, SPME, LPME에서 일반적인 조절 인자중의 하나이다. 일반적으로 염을 첨가하면 수용성 시료에 존재하는 분석물의 용해도가 감소하고 유기 용매로의 분배가 크게 향상되어 추출 효과를 증가시킬 수 있다.⁷

3.2. 표준물 검정곡선과 농축 인자

표준용액을 증류수 4 mL에 100, 300, 600, 1000 ng/mL가 되도록 spike시킨 후 확립된 추출조건으로 추출하여 GC/TID(NPD)에 주입하여 표준물 검정곡선

을 작성하였다. 그 결과 직선식은 $y=0.0074x+0.0474$ 이며, 회귀 계수(correlation coefficient, R^2)는 0.9994의 좋은 직선성을 나타내었다(Fig. 6).

시험 결과에서 농도별 표준물에 대한 평균 상대회수율($= \frac{C_{\text{measured}}}{C_{\text{Calculated}}} \times 100$)은 102%이었고, 상대표준편

차는 1.64~2.90%으로 좋은 정확도와 정밀도를 보여 주었다.

농축 인자(EP)를 계산한 결과들은 Table 3에 나타내었는데 평균 농축인자(EF)는 반계용매(추출용매) 중에서의 분석물질의 농도를 주계용매(수용액 시료) 중에서의 분석물질의 농도로 나눈 값으로서 101이었다. 이는 분석물질이 추출용매 중에서 100배 정도 농축된 효과를 나타내는 결과이므로 HF-LPME 방법이 절대 회수율은 낮을지라도 농축인자가 높아서 시료 중에 낮은 농도로 존재하는 분석물질도 어렵지 않게 분석이 가능함을 보여주는 결과이다.

3.3. 검출한계와 정량한계

LOD(Limits of detection, 검출한계)와 LOQ(Limits of Quantification, 정량한계)는 최적의 추출조건으로 시료를 추출한 후 GC/NPD를 이용하여 설정하였다. 검출한계는 신호 대 잡음비가(S/N ratio)가 3 이상되는

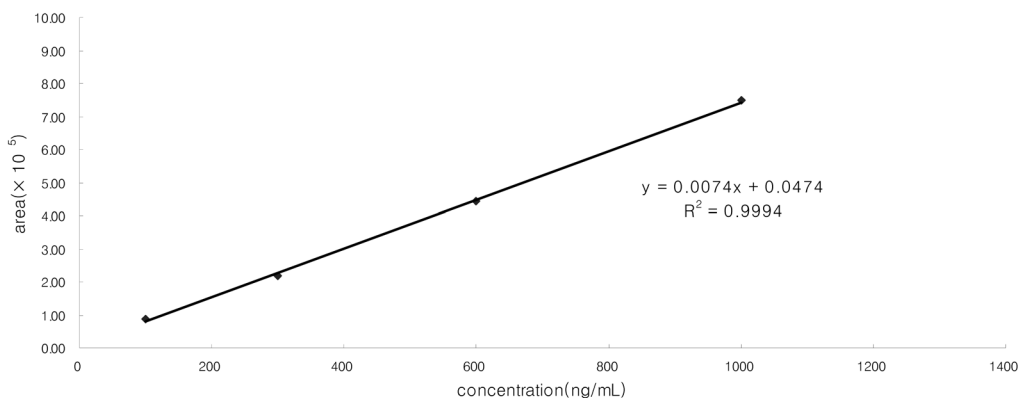


Fig. 6. Calibration curve for the measurement of standard caffeine by HF-LPME.

Table 3. Relative recovery(%) and enrichment factor of caffeine into aqueous phase-toluene phase

	Initial caffeine concentration (ng/mL)				mean (n=3)
	100	300	600	1000	
Relative recovery(%)	110	97	99	100	102
RSD(%)	2.35	4.68	1.64	2.90	2.89
Enrichment factor ^a	110	97.0	98.7	100	101

a : concentration of caffeine in organic solvent / concentration of caffeine in aqueous solution

Table 4. Quantitative analysis of caffeine in urine and beverage

sample	Concentration(ppm)			
	1	2	3	average
urine	2.16	2.07	2.07	2.10
mixed tea	4.93	4.79	5.15	4.96
green tea (1)*	27.4	27.7	27.6	27.6
green tea(2)**	24.7	21.7	22.7	23.0
coffee	526	524	445	498

*1st brew-up green tea

**2nd brew-up green tea

농도로 설정하였고, 신호 대 잡음비(S/N ratio)가 10 이상이고 정밀도(RDS)가 20% 이내인 농도를 정량한 계로 정하였다. 그 결과 카페인의 검출 한계는 2.5 ng/mL이고 정량 한계는 10.0 ng/mL이었다.

3.4. 실제시료의 분석

사람의 뇨는 1일 3회(아침, 점심, 저녁) 커피를 섭취한 후 오후 9시에 시료를 채취하였고, 음료는 일반 시장에서 판매되고 있는 혼합차 음료를 구입하였고 녹차 티백을 정수기 온수(약 80°C) 140 mL에 1초에 1번씩 담글질 하여 30초간 우려낸 후 사용한 녹차티백을 같은 조건에서 또 다시 우려내어 준비하였다. 그리고 커피 알갱이를 따뜻한 물 100 mL에 1.5 g을 녹인 후 실린지 필터를 이용하여 거르기를 하였다. 각각의

시료는 50 mL를 취하여 원심분리기를 이용하여 4500 RPM으로 4에서 10분간 동작 시킨 후 상층액을 취하여 예비 시험을 한 후 카페인의 정량 확인을 사람의 뇨는 1/4배, 녹차음료는, 1/10배, 녹차 티백을 온수에 우려낸 것은 1/50배, 커피는 1/500배 희석하여 최적의 추출조건으로 추출 후 정량 분석하였다.

사람의 뇨에서는 2.10 µg/mL, 혼합차 음료는 4.96 µg/mL, 녹차 티백을 1번과 2번 우려낸 녹차에서는 27.6 µg/mL와 23.0 µg/mL, 커피 알갱이만 녹인 시료는 498 µg/mL의 농도를 확인할 수 있었다(Table 4). 희석 전에 분석한 각각의 시료의 크로마토그램은 Fig. 7에 나타내었다.

4. 결 론

막대형 HF-LPME를 이용하여 간편하고 효율적으로 카페인을 분석하기 위한 최적의 조건을 확립하고자하였다. HF-LPME를 이용한 카페인 분석에 있어서 확립된 추출 방법 및 조건을 바탕으로 사람의 뇨, 녹차, 커피에 함유되어 있는 카페인을 정량 하였을 때 높은 재현성을 확인할 수 있었으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 수용성 시료로부터 카페인을 추출하기 위한 수집 용액의 선정을 위해서 여러 유기 용매들에 대한 카페

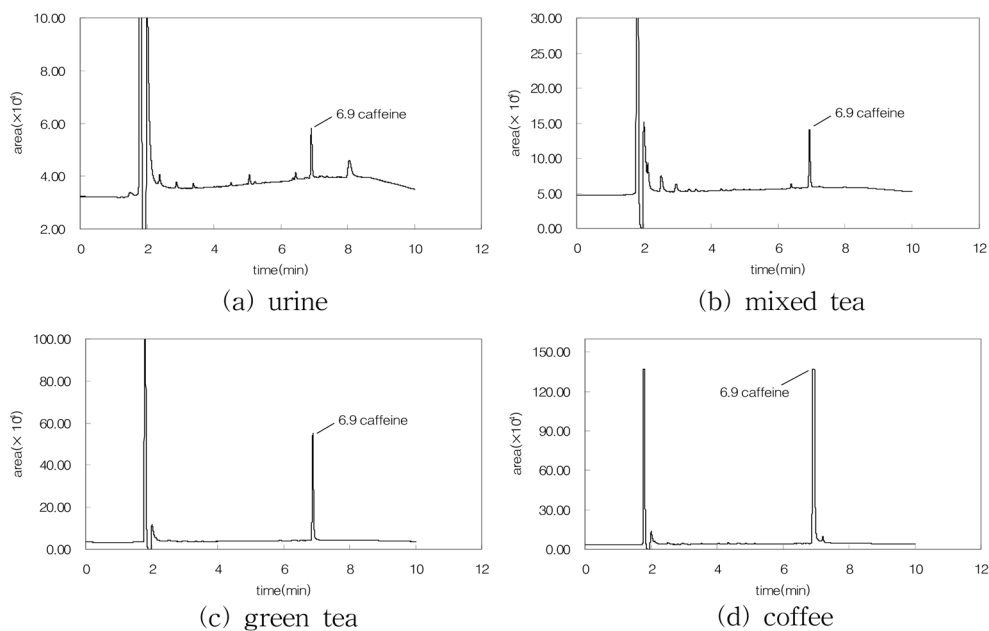


Fig. 7. Chromatograms of various samples by GC-NPD after HF-LPME extraction.

인의 추출률을 비교한 결과 톨루엔이 HF에 고정화(immobilizing)가 가장 잘 되었으며 추출 효율도 상대적으로 좋았다. 따라서 HF-LPME에 사용되는 수집용액은 톨루엔을 사용하였다.

2. 추출 시간의 단축을 위하여 추출과정에서 시료의 교반 여부에 따라 최적의 추출시간을 비교 실험해 보았다. 시료를 교반하지 않았을 때는 최대 추출률이 평형이 되는 시간은 10분이었으나, 1100 RPM으로 교반을 하였을 때는 3.5분으로 추출시간이 7분이 단축되었다.

3. 추출 과정에 있어서 카페인을 수용액 시료로부터 효과적으로 추출하기 위한 pH 및 염석효과를 살펴 보았는데, pH 10과 NaCl이 시료에 포화가 될 때 가장 높은 추출률을 나타내었다.

4. 카페인이 함유된 수용액 100~1000 ng/mL의 범위에서 검정곡선을 작성하였는데 직선식은 $y=0.0074x+0.0474$ 이며, 회귀계수(correlation coefficient, R^2)는 0.9994의 좋은 직선성을 나타내었다.

LOD 및 LOQ는 2.5 ng/mL와 10 ng/mL이었고 평균 상대회수율은 102%, 상대표준편차(RSD)는 1.64~2.90%으로 좋은 정확성과 정밀성을 보여 주었다. 그리고 평균 농축인자(EF)는 101로써 시료의 증축 효과가 컸다.

5. HF-LPME를 이용하여 확립된 조건들을 바탕으로 사람의 뇨와 녹차, 커피 그리고 드링크제에 대해 카페인의 함량을 측정할 수 있었다.

본 연구를 통하여 얻어진 결과로 막대형 HF-LPME는 비용이 저렴하며, 추출 및 분석시간뿐 만 아니라 실제 시료를 이용하여 정량했을 때 높은 재현성을 나타내었다. 또한 이 추출법은 대부분의 수용성 시료에 적용이 가능하므로 여러 분석에 있어서 시간 및 비용을 절감할 수 있을 것이라 기대된다.

참고문헌

1. R. E. Majors. LC-GC Int. 4, **27**, 1879(1993).
2. B. M. Mahara, J. Borossay and K. Torkos, *Microchemical Journal*, **58**, 31-38(1998).
3. A. Balinova, *Journal of Chromatography A*, **754**, 125-135(1996).
4. E. Psillakis and N. Kalogerakis, *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, No. 10(2003).
5. L. Zhao and H. K. Lee, *Journal of Chromatography A*, **919**, 381-388(2001).
6. J. A. Jonsson and L. Mathiasson, *Trends in Analytical Chemistry*, **18**, No. 5(1999).
7. D. A. Lambropoulou and T. A. Albanis, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 195-228(2007).
8. H. H. Wan and M. W. Wong, *J. Chromatogr. A*, **754**, 43-47(1996).
9. H.-A. Lakso and W. Fang Ng, *Anal. Chem*, **69**, 1866-1872(1997).
10. C. Basheer, V. Suresh, R. Renu and H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **1033**, 213-220(2004).
11. C. Basheer, R. Balasubramanian and H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **1016**, 11-20(2003).
12. L. Hou, G. Shen and H. K. Lee, *J. Chromatogr. A*, **985**, 107-116(2003).
13. C. Wang, C. Li, X. Zang, D. Han, Z. Liu and Z. Wang, *J. Chromatogr. A*, **1143**, 270-275(2007).
14. 명승운, 정홍래, *Anal. Sci. & Tech.* **18**, 224-231(2005).
15. S.-W. Myung, S.-H. Yoon and M.-S. Kim, *Analyst*, **128**, 1443-1446(2003).
16. K. E. Rasmussen and S. Pedersen-Bjergaard, *Trend in Analytical Chemistry*, **Vol. 1**(2004).
17. J. A. Jonsson and L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A*, **902**, 205-225(2000).
18. H. G. Uglund, M. Krogh and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr. B*, **749**, 85-92(2000).
19. J.-S. Chiang and S.-D. Huang, *Talanta*, **71**, 882-886(2007).
20. S.-P. Huang and S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A*, **1135**, 6-11(2006).
21. B.-W. Lai, B.-M. Liu, P. K. Malik and H.-F. Wu, *Anal. Chim. Acta*, **576**, 61-66(2006).
22. T. S. Ho, S. P. Bjergaard and K. E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A*, **963**, 3-17(2002).