

화학실험 (004): HPLC에 의한 아데닌과 카페인 분리 결과보고서

제출일 2023.03.30

담당 교수님: 이은성 교수님

담당 조교: 백승현 조교

공과대학 컴퓨터공학부

강명석 (2024-10387)

실험개요

실험은, HPLC를 사용해 크로마토그래피를 체험한다. 먼저 고성능 액체 크로마토그래피에 아데닌과 카페인 용액을 사용한다 분석을 진행한다. 그리고 같은 카페인 용액과 아데닌 용액을 각기 다른 파장 (250nm, 260nm, 270nm, 280nm)에서 진행하여 가장 높은 흡광도가 나오는, 즉 측정하기에 적절한 파장이 어느 것인지 판단해본다. 마지막으로, 농도가 각기 다른 카페인 용액을 사용하여 분석 그래프의 면적 - 농도간의 관계를 예측하고 예측을 통해 커피 용액의 농도를 정량적으로 측정한다.

실험1 Data & Result

1) 아데닌과 카페인의 분리

수집 프로그램을 실행한 후 수집시간을 5분, 측정 차장을 260nm로 설정해주었다. 준비한 300μM 아데닌 용액을 헤밀턴 주사기를 사용하여 시험관에 40μL 가했다. 실험결과 약 2분 5초대 전후로 아데닌이 검출된 것을 확인할 수 있었다.

같은 실험을 500μM 카페인 용액에 대해서도 진행해주었다. 먼저 주사기를 카페인 용액으로 워싱한 후, 용액 40μL를 시험관에 넣어주었다. 분석결과 아데닌과는 다르게 2분 55초대에 집중적으로 카페인 검출된 것을 확인할 수 있었다.

실험2 Data & Result

1) 아데닌과 카페인의 흡수 스펙트럼

아데닌과 카페인 1mL를 취해 2mL의 혼합용액을 제작하였다.

파장을 250nm로 설정한다. 같은 용액으로 세척한 헤밀턴 주사기를 통해 40mL정도를 취한 후, HPLC주입구에 주입해 분석한다. 5분간 측정을 진행한 후, 같은 방법으로 실험을 통 네 번 진행한다. 이때, 다른 조건은 모두 같게 하되 파장을 각각 250nm, 260nm, 270nm, 280nm로 바르게 하여 측정을 진행한다.

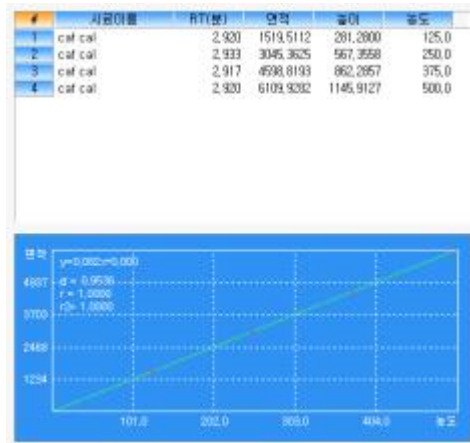
실험결과, 270nm에서 가장 높은 수준의 흡광이 발생하는 것을 알 수 있었다.

이에 실험3에서 측정파장을 270nm로 설정한다.

실험3 Data & Result

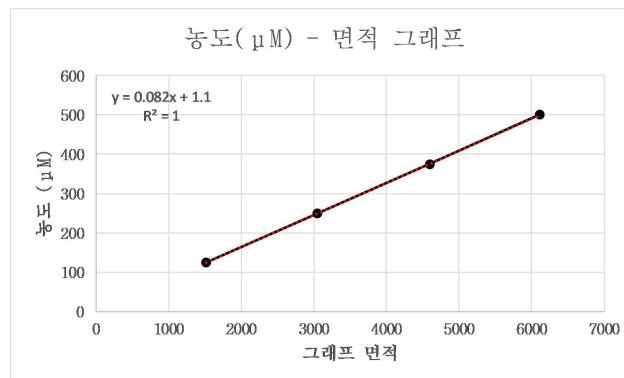
1) 카페인 용액의 정량분석

카페인 500 μ M와 전개액을 일정비율로 섞어 125 μ M, 250 μ M, 275 μ M 용액을 제작한다. 한편, 커피용액을 마찬가지로 전개액을 사용해 1/5로 묽힌다. 묽힌 카페인 용액들과 카페인 500 μ M 용액 총 4개의 용액을 'caf cal'이라는 이름으로 시료에 추가한 후, HPLC로 분석해주었다. 분석한 그래프를 적분하며 면적을 계산하였다. 아래 표는 카페인의 농도에 따른 적분값이다.



2) 커피 용액의 정량분석과 농도 예측

앞서 만들어둔 커피를 1/5로 묽힌 용액을 카페인 용액과 같은 방법을 사용하여 HPLC측정한 후, 그래프 면적을 계산해주었다. 계산한 그래프 면적은 6691이었다.



앞서 구한 면적 - 농도 그래프와 커피 용액의 그래프 면적을 이용하여 커피용액의 농도를 계산할 수 있다. 그래프의 면적을 x, 농도를 y μ M이라고 한다면, 두 변수 사이에는 $y = 0.082x$ 관계가 성립한다. 산출한 계산식을 바탕으로 묽혀진 커피 용액의 농도를 계산하면 아래와 같다.

$$6691 * 0.082 = 549 (\mu\text{M})$$

Discussion

실험1을 진행한 결과, 아데닌이 카페인보다 더 이른 시간에 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 아데닌이 카페인보다 정지상과 상호작용을 덜 하여, 이동속도가 느리기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 또한 실험3을 진행한 결과, 산출된 그래프의 아래 면적과 농도 그래프가 선형성을 가지고 있음을 확인하였다. 이것을 통해 비어-램버트 법칙을

실험적으로 체험할 수 있다.

실험을 진행하며 오차가 발생했을 수 있다. 오차의 원인은 다양하게 존재할 수 있지만, 주된 오차 원인 몇 가지를 추측할 수 있다. 희석 중 발생한 실험오차는 가장 큰 오차 원인 중 하나일 것이다. 완벽하게 맞추지 못한 눈금이나, 또는 완벽하게 씻기지 못한 실린더가 희석한 용액의 농도를 실제 농도와 다르게 만들었을 수 있다. 기계의 측정오차또한 발생한 오차 중 하나일 것이다. 실제로, 같아야 하는 그래프의 카페인 용액들의 peak시간대가 용액마다 다르게 나오는 것을 확인할 수 있었다. 이들을 비롯한 여러가지 오차가 혼합되어 오차가 나타날 것이다.

Assignment 1

실험3의 결과분석에 근거하여, 5배 묶힌 커피 용액의 카페인 농도가 $549\mu\text{M}$ 임을 알았다.

이를 토대로 커피 용액의 카페인 농도가 $2745\mu\text{M}$ 임을 알 수 있다. 즉, 커피 1L에 들어있는 카페인이 $2745\mu\text{mol}$ 이라는 것을 예측해볼 수 있다.

계산할 결과에 커피 100mL에 들어있는 카페인의 양은 $274.5\mu\text{mol}$ 이 되고, 카페인의 분자량이 194.2g/mol 인것을 고려하면, 커피 100mL에 들어있는 카페인의 질량은 53.3mg 임을 알 수 있다.

Assignment 2

분석 실험에서 나타난 그래프의 면적은 용액의 농도에 비례한다. 실험에서 나타는 커피용액의 면적이 6691이었으므로, 용액의 농도가 1.75배가 된다면 면적은 11710이 될 것이다.

Reference

Peter Atkins, Loretta Jones, Leroy Laveman 『화학의 원리(제7판)』, 김관, 김병문, 이상엽, 정두수, 정영근, 자유아카데미, 2018

김희준, 『일반화학실험』, 자유아카데미, 2010, 55~59p

실험 랩노트

『HPLC에 의한 카페인과 아데닌의 분리』

실험 3

125 μ M 면적: 1520 mV \cdot sec

250 μ M 면적: 3045 mV \cdot sec

375 μ M 면적: 4599 mV \cdot sec

500 μ M 면적: 6110 mV \cdot sec

1/2 커피용액 면적: 6691 mV \cdot sec

*가동검량이 되기 많아 추세선에 직접 대입해야 함

$$y = 0.082x + 0.000$$

↳ 농도: 549 μ M.

