

# 화학실험 (004): HPLC에 의한 아데닌과 카페인 분리 예비보고서

제출일: 2023.03.30

담당 교수님: 이은성 교수님

담당 조교: 백승현 조교

공과대학 컴퓨터공학부

강명석 (2024-10387)

## 실험목표

크로마토그래피를 이용한 실험을 통해 극성 그리고 비극성 분자간의 상호작용에 대해 체험한다. 두 분자 아데닌과 카페인 구조 그리고 용리시간을 알아내보며, 이때 고성능 액체크로마토그래피를 사용한다. 또한 얻은 각각의 흡수 스펙트럼을 이용하여 커피 한 잔에 포함된 카페인 양을 정량적으로 측정해본다.

## 실험배경

### 1) 크로마토그래피

크로마토그래피는 물질을 분리해내는 방법중 하나다. 크로마토그래피에는 정지상과 이동상이라는 것이 있다. 정지상을 고정시킨후, 이동상을 고정상에 적시거나, 통과하게 하여 물질을 분리해낸다. 이동상이 여러가지 물질로 구성되어있다면, 각 구성물질마다 고정상과의 상호작용 정도에 차이가 있어 이동속도에 차이가 생기게 된다. 이때문에 정지상을 통과해 나오는 이동상은 정지상과 상호작용을 잘 하지 않는 물질 순으로 분리되어 나오게 된다.

### 2) 비어-램버트 법칙

흡수 스펙트럼의 측정에서는 비어-램버트의 법칙이 사용된다. 이것은 빛이 어떤 용액을 통과했을 때, 입사광 그리고 투과광의 광도 비율은 물질의 농도, 흡광도 그리고 빛의 경로 길이의 곱으로 표현할 수 있다는 법칙이다. 흡광도는 파장에 따라 다른 값을 가질 수 있다.

$$A = \epsilon bc$$

## 실험 준비물

HPLC, Hamilton 주사기, 마이크로피펫, C18 칼럼관 전개액(증류수와 메탄올의 60 : 40 부피 혼합 용액), 300 $\mu$ M 아데닌 용액, 500 $\mu$ M 카페인 용액, 1/10로 묽힌 커피 용액, 실험 데이터를 저장할 플래시 메모리.

## 실험과정

### 1) 아데닌과 카페인 분리

미리 준비된 300 $\mu$ M 아데닌 용액과 500 $\mu$ M 카페인 용액을 2mL씩 15mL 시험관에 가한다. 이후 프로그램을 켜고 후 수집 시간을 5분, 측정 파장을 260nm로 설정한다. Hamilton 주사기를 아데닌 용액을 이용하여 행귀낸 뒤, 적절한 시료의 이름을 설정한다. 모든 설정이 이루어진 뒤, 용액 80 $\mu$ L를 20 $\mu$ L injection loop에 채운다. 핸들을 돌려 측정을 시작한다. 아데닌 용액의 크로마토그램을 얻은 후, 같은 실험 과정을 아데닌 대신 카페인을 사용하여 진행한다.

### 2) 아데닌과 카페인의 흡수 스펙트럼

아데닌과 카페인 흡수 스펙트럼을 알면 그것이 빛을 가장 잘 흡수하는 파장을 알 수 있기에 미량의 화합물을 더 민감하게 검출할 수 있다. 아데닌과 카페인 용액을 덜어온다 이후 용액을 1mL씩 취해 혼합물 시료를 만든다. 수집시간을 30분, 파장을 250nm로 설정한다. 이후 해당 설정에서 나타나는 최대 흡광도를 측정한다. 측정이 완료되면, 파장을 10nm씩 증가시켜 다시 측정을 진행하여 각각의 크로마토그램을 얻는다. 250nm부터 280nm까지 측정을 진행한다.

### 3) 커피에 들어있는 카페인의 정량 분석

500 $\mu$ M 카페인 용액을 묽여서 5mL의 200 $\mu$ M, 100 $\mu$ M의 카페인 용액으로 만든다. 이때 증류수와 메탄올의 6:4 부피 혼합 용액으로 카페인 용액을 묽힌다. 이후 1/10 비율로 묽힌 커피 1mL를 가져온다. 수집시간을 5분, 검출기 파장을 270nm로 설정한다. 이후 만들어진 용액을 적절히 혼합하여 묽힌 커피 용액의 크로마토그램과 125 $\mu$ M, 280 $\mu$ M, 375 $\mu$ M, 500 $\mu$ M 카페인 용액에 대한 크로마토그램을 얻는다. 얻은 크로마토그램들을 바탕으로 커피 용액의 농도를 예측한다.

## 유의사항

유리기구를 사용하기 전에는 유리기구에 오염이나 손상이 있는 지 확인한다.

시약을 다룰 때 보호장갑/보호의/보안경/안면보호구를 착용한다.

메탄올은 열이나 스파크로부터 멀리해야하며, 사용 후 용기를 밀폐해야 한다.

## 참고문헌

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

김희준, 『일반화학실험』, 자유아카데미, 2010, 55~59p

안전보건공단, “MSDS검색”, 안전보건공단 화학물질정보, 2017.12.20,  
<https://msds.kosha.or.kr/MSDSInfo/kcic/msdsdetail.do#>