



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

Headspace in-tube  
microextraction of chlorophenols  
using a capillary inserted 3D-  
printed electrophoresis unit

모세관 삽입형 3D-printed 전기영동 장치를  
이용한 chlorophenol 화학종의 상공 관내 미세  
추출법

2018년 2월

서울대학교 대학원  
화학부 분석화학전공  
이 호 균

## 국문 초록

우리는 액체 plug를 주입한 capillary를 run buffer이자 acceptor phase로 사용한 headspace in-tube microextraction (ITME) 용 capillary-inserted 3D-printed electrophoresis unit을 제작하였다. 분석 과정의 간소화를 위하여 이번 실험에서는 전기 영동 과정에서 이용하는 run buffer를 acceptor plug로 사용하였다. Chlorophenol 시료들은 0.1 M HCl에 녹인 뒤 pH 9.8 borate run buffer로 ITME를 통한 10분 추출 결과 12-150배 농축되었다.

주요어 : 3D printer, Chlorophenol, 상공 추출법, 관내 미세 추출법  
학 번 : 2014-21238

# Table of Contents

Chapter 1. Introduction.....	1
Chapter 2. Experimental.....	3
Chapter 3. Results and discussion.....	4
Chapter 3.1. 상용 장비를 이용한 실험의 확인 .....	4
Chapter 3.2. 3D printed unit에 적용 - 모델 디자인 및 출력 준비 .....	7
Chapter 3.3. 검출기.....	12
Chapter 3.4. Electrophoresis by 3D printed CE.....	17
Chapter 3.5. HS-ITME by 3D printed CE.....	18
Chapter 3.6. Paper HS-ITME by 3D printed CE .....	20
Chapter 3.7. Run buffer optimize for 3D printed CE with UV detector...	22
Chapter 3.8. CZE by 3D printed CE with UV detector .....	24
Chapter 3.9. HS-ITME by 3D printed CE with UV detector .....	25
Chapter 4. Conclusion.....	26
Bibliography .....	27
Abstract .....	28

# Chapter 1. Introduction

최근 3D printer가 차세대 기술로써 주목 받고 있다. 과거 rapid prototyping으로 표현되던 기술은 주로 산업에서 시제품 제작을 위하여 사용되던 기술이었다. 그러나 여러 특허가 만료되어서 대중화가 급격히 이루어졌고, 그로 인해 이를 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 3D printing은 디지털로 디자인 된 3차원 데이터를 실제 형태로 출력하는 기술이다. 출력하기 위한 사물의 3차원 정보는 3D 스캐너를 이용하여 읽어 들이거나 3D modeling 프로그램을 이용하여 직접 모델링을 진행한 뒤 인쇄하는 방식을 택한다. 최초 3D printer를 이용하는 분야는 과거 산업장비, 의료기구 등에 한정되어 있었으나 저렴한 가격의 3D printer가 보급됨에 따라 취미, 생활소품, 요리 등의 여러 분야에서 이용되고 있다. 이 외에도 이공학, 의치학 등 학계에서는 3D 프린팅을 적극적으로 이용하고 있으며 최근에는 일반인들에게도 접근성이 좋아져 다양한 출력물의 원본 소스가 인터넷을 통해 전파되고 공유되고 있다.

실제 환경 오염 현장에서 오염물질을 분석하는데 주로 이용되는 방법은 headspace extraction이다. Headspace (HS) extraction은 volatile material을 complex matrix에서 분리해내는데 매우 유용하게 이용할 수 있는 방법이다. HS extraction에 대표적으로 적용할 수 있는 방법은 고체상 미세 추출법과 액체상 미세 추출법의 두 가지가 있다. 고체상 미세 추출법은 추가적인 추출 물질과 장비가 필요하나 그에 비해 액체상 미세 추출법은 별다른 특별한 장비가 필요하지 않다는 장점이 있다. 액체상 미세 추출법과 상공 추출법의 결합 방법 중 가장 널리 이용되는 것이 단일 방울 미세 추출법 (single drop microextraction, SDME)로 이 방법은 GC와 LC 등에 널리 이용되고 있다. SDME는 매우 큰 시료 대 반개층 부피비와 반개층의 표면적 대 부피비를 가지는데, 이를 이용하여 짧은 시간안에 시료를 주개층에서 반개층으로 효과적으로 추출할 수 있는 실험 방법이다. 모세관 전기영동 (capillary electrophoresis, CE) 에서는 추출 과정에서 별도의 syringe를 사용하지 않고 모세관 끝 부분에 방울을 만들어 on-line coupling을

진행하여 실험을 진행하였다[1-4].

그러나 SDME에서는 실제 실험을 진행함에 있어 방울을 유지하기 힘든 문제가 있다. 이를 개선하기 위한 방법이 관내 미세추출법 (in-tube microextraction, ITME) [5]으로써 반개층을 관 내부로 만들어 추출을 진행하는 것이다. 이 경우 시료 대 반개층의 부피비를 더 크게 할 수 있어 더욱 효율적인 추출이 가능하며 관 내에 반개층이 존재하게 되므로 안정적인 추출이 가능하다.

이번 실험에서는 위 추출 방법을 적용한 3d printed unit을 제작하여 실험을 진행하였다. 3d printer로 실험 장비를 구상, 제작한 뒤 모세관을 삽입하여 miniaturized CE를 제작하여 실험을 진행하였으며, VOC를 액체상에서 추출 및 농축하기 위하여 HS-ITME를 접목하여 실험을 진행하였다. 대상 시료는 환경 오염 물질로 알려져 있는 trichlorophenol의 구조 이성질체를 추출하여 분리 분석하는 실험을 진행하였다.

## Chapter 2. Experimental

### 2.1. Reagents

모든 종류의 Chlorophenol (CP), Dichlorophenol (DCP), Trichlorophenol (TCP)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다. Methanol도 역시 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 HPLC grade를 사용하였다. Deionized water의 경우 Thermofisher (Waltham, MA USA)사의 Labtower EDI 제품을 이용하여 얻었다. 시료는 10 mM의 stock solution을 methanol에 녹인 뒤 4도씨의 암실에 보관하였다. 실험에 사용된 buffer는 10 mM phosphate와 10 mM borate buffer, 200 mM borate buffer 였으며 이는 sodium phosphate monobasic과 sodium tetraborate decahydrate를 이용하여 만들고 pH는 sodium hydroxide를 이용하여 조절하였다. HS-extraction시의 doner는 1 mM HCl에 녹여 준비하였다. 실험에 사용한 3D printer는 Sindow 사의 3dwox를 사용하였다.

## Chapter 3. Results and discussion

### 3.1. 상용 장비를 이용한 실험의 확인

실험과정은 우선 상용 CE 장비를 이용하여 클로로페놀류의 고감도 검출을 위한 HS-ITME-CE의 다양한 변수들을 최적화하였다. 해당 분석물질에 대한 최적화를 진행하면서 3D printed unit에 적용할 조건을 최적화 및 확인하여 적용할 수 있도록 하였다.

상공 추출(headspace extraction)에서 사용하는 계(system)는 주개층, 상공(HS), 받개층으로 이루어진다. HS-ITME에서 주개층은 주로 수용액 시료이고, 주개층과 받개층 사이의 공간을 HS라 하며, 받개층은 모세관 안의 용액이다. HS-ITME는 받개층이 모세관 안에 이미 들어가 있으므로 별도의 주입 절차 없이 농축되는 동시에 주입되기 때문에 간편한 농축법이다. 산성 시료 HA를 HS-ITME에 적용하면, 수용 주개층(d), HS(h)와 수용 받개층(a)으로 이루어진 3-phase 시스템에서 각 층 간의 분배계수  $D$ 에 의해 분배된다.

$$D_a = C_h / C_a D_d = C_h / C_d \quad (1)$$

여기서  $C$ 는 각 층에서의 시료 농도이다. 질량 보존의 법칙에 의해 평형 상태의 농축비  $EF_{eq}$ 는 주개층의 시료 초기 농도와 평형 상태의 받개층의 시료 농도의 비로 결정된다.

$$EF_{eq} = \frac{C_{a, equilibrium}}{C_{a, initial}} = \frac{1}{(D_a / D_d) + D_a (V_h / V_d) + (V_s / V_d)} \quad (2)$$

여기서  $V$ 는 각 층의 부피이다. 주개층의 pH가 시료의 pKa보다 낮고 받개층이 염기성일 경우 산성 시료는 주개층과 HS에서 중성 상태 HA로, 받개층에서 이온화된  $A^-$ 의 형태로 존재한다. 분배계수  $D_d$ 는 헨리 상수  $k_H \equiv [HA]_h / [HA]_d$ 와 같아지며, 분배계수  $D_a$ 는 다음과 같이 나타난다.

$$D_a = \frac{k_H}{(K_a / [H^+]_a) + 1} \quad (3)$$



표 1. Dichlorophenol 화학종의 pKa와 끓는점

분석물질	pKa	끓는점(°C)
2,3-Dichlorophenol	7.70	206
2,4-Dichlorophenol	7.89	210
2,5-Dichlorophenol	7.51	211
2,6-Dichlorophenol	6.79	220
3,4-Dichlorophenol	8.63	253
3,5-Dichlorophenol	8.18	233

표 1에 나와 있는 헨리 상수와 pKa에 의하여 받개층의 pH가 9.0일 경우,  $D_d \sim 10^{-5}-10^{-2}$ ,  $D_a \sim 10^{-9}-10^{-4}$  로 어림잡을 수 있다.  $V_d \sim V_h \sim 1$  mL 이며  $V_a \sim 1$   $\mu$ L일 경우 식 (5)로부터 EF는 다음과 같이 근사된다.

$$EF_{eq} \approx \left[ \frac{[H^+]_a}{K_a} + \frac{V_a}{V_d} \right]^{-1} \quad (4)$$

평형 상태에 도달하기 전에 한정된 시간 t 동안 추출 후, 받개층의 분석물질 농도는 속도상수  $\beta$ 에 의해 다음과 같이 표현된다.

$$C_a(t) = [1 - \exp(-\beta)] C_a \quad (5)$$

속도상수  $\beta$ 는 받개층의 표면적(A), 질량이동 상수(mass transfer coefficient, ma)와 주개층으로부터 HS로의 증발상수(k)에 의해 다음과 같이 근사될 수 있다.

$$\beta = 2Am_a \frac{k(D_d/D_a)V_a + kD_dV_h + kV_d}{2m_a(V_aV_d/D_a) + kD_d} V_aV_h + kV_aV_c \quad (6)$$

추출 시간이 짧을 경우 받개층에서 분석물질 농도와 EF는 다음과 같이 간단히 표현된다.

$$C_a(t) \approx EF_{eq} C_{d,initial} t \quad (7)$$

$$EF(t) \approx \frac{A}{V_a} m_a K_a k k_H \left( m_a K_a + \frac{1}{2} k k_H [H^+]_a \right)^{-1} t \sim \frac{A}{V_a} t \quad (8)$$

위의 식 (8)의 첫 번째 인자  $A/V_a$ 가 받개층과 관련된 부분이다. 받개층의 부피가 작아짐에 따라  $A/V_a$ 는 증가한다. 따라서 받개층의

부피가 작을수록 EF가 커지기 때문에 검출 한계를 더욱 낮출 수 있다. ITME에서 추출 물질이 길이  $l$ 의 반개층 plug에 균일하게 분포된다고 가정하면 EF는  $1/l$ 에 비례하게 된다. 반개층의 길이를 확산계수  $\delta$ 인 분석물질이 반개층에서 일차원적 확산하는 평균 거리로 가정하면  $l = \sqrt{2\delta t}$ 가 된다. ITME에서 모세관 입구의 면적이 작아서 반개층으로 들어가는 분석물질의 양이 적다. 하지만 들어간 분석물질을 100% 이용할 수 있기에 HS-SDME보다 HS-ITME의 농축 효율이 더 커지게 될 것이다.

HS-ITME에서는 휘발성 분석물질의 손실을 막기 위해 시료 바이알을 랩으로 씌워 두었다가, 그대로 모세관이 랩을 뚫고 바이알에 들어가므로 전 과정이 자동화되어 진행된다.

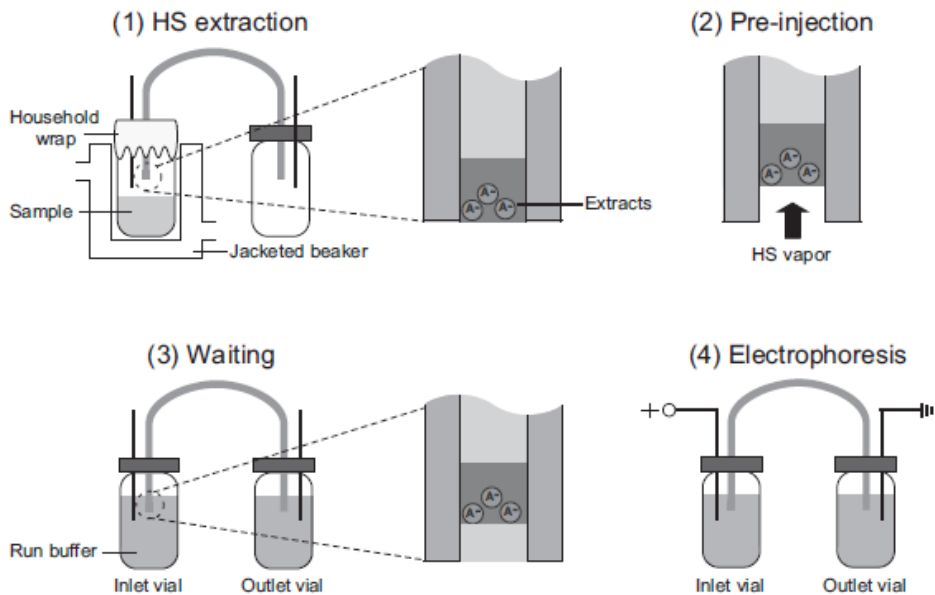


그림 1. HS-ITME의 진행 과정

위의 그림과 같이 시료를 담은 바이알 안에 완충용액을 채우고, 반개층을 채운 모세관을 배치한다. 추출 과정에서 모세관은 시료의 수면 바로 위에 놓이고, 시료 내의 휘발성 물질이 기화하여 모세관의

반개층으로 포집되어 농축된다. 포집된 이후에는 반개층의 높은 pH에 의해 이온화되어 다시 HS로 돌아가기 어려워져 보다 완전한 추출이 가능해진다. 상용 CE 장비의 경우, CE를 진행하기 위해 모세관을 완충용액에 넣고 전압을 걸 때, 수 초의 시간이 소요된다. 그런데 추출된 분석물질의 대부분은 모세관의 입구에 농축되어 있으므로, 수 초 동안 상당량의 분석물질이 완충 용액으로 빠져 나가게 될 것이다. 이를 막기 위해 HS-ITME로 시료를 농축한 후, HS vapor를 추가로 pre-injection 하여 농축된 분석물질을 모세관 안쪽으로 넣어 보호한다. 모세관 주입부를 완충용액으로 넣은 후에는 약 30초 동안 기다려서, HS vapor plug이 녹아 없어지게 한다. 이렇게 전기적 회로를 회복한 후, 전압을 가하여 CE를 진행한다.

위와 같은 방법으로 실험을 진행하여 실험 가능 여부를 확인하였고 이후 이 결과를 바탕으로 3D printed unit에 적용하기 위한 준비를 진행하였다.

### **3.2. 3D printed unit에 적용 – 모델 디자인 및 출력 준비**

3D printer로 출력하기 전 먼저 3D modeling을 진행하였다. 실제 실험에서 이용할 부분은 buffer reservoir와 capillary를 고정할 수 있는 모양이기 때문에 그림 2와 같은 모양을 이용, 고정하여 실험을 진행할 수 있도록 디자인하였다. Buffer reservoir간의 거리가 너무 가까울 경우 3D printer에서 이용하는 소재의 특성상 액체의 통로가 발생하여 전기가 흐르게 되고, 그로 인해 capillary에 전기가 흐르지 않음으로 인해 실험이 되지 않는 것을 확인하여 buffer reservoir간의 거리를 좀 더 여유 있게 디자인했다. 추가로 buffer reservoir가 너무 낮을 경우 holder의 위 판을 통해 액체가 흐르게 되어 run buffer를 통한 전류 흐름이 발생하는 것을 확인, ㄷ 자 모양으로 디자인을 변경하여 실험을 진행하였다. 추가로 앞으로 이용할 headspace 추출을 위해 시료가 들어갈 holder를 추가로 배치하였다.

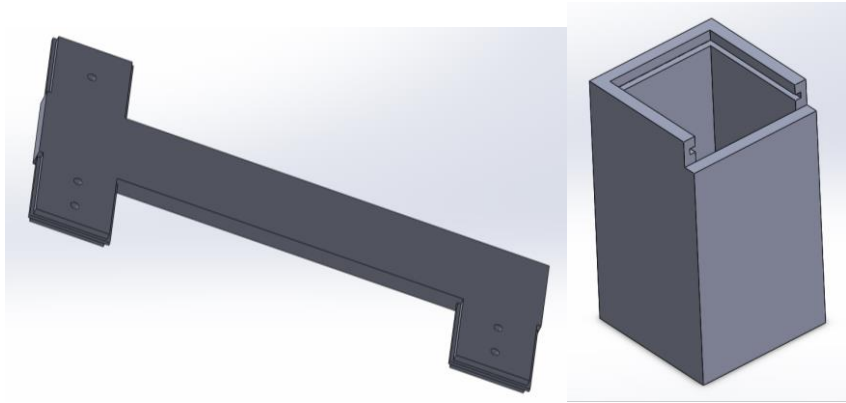


그림 2. 장비 디자인 도면. 왼쪽은 컨테이너를 연결하는 위쪽 부분으로, 전류가 흐르지 않도록 ㄷ자 구조를 띄게 만들었다. 추후 종이 시료를 이용한 추출 진행을 위해 위쪽에 capillary만 들어갈 수 있는 구멍을 뚫은 뒤 그 구멍을 통해 추출이 가능하도록 제작했다.

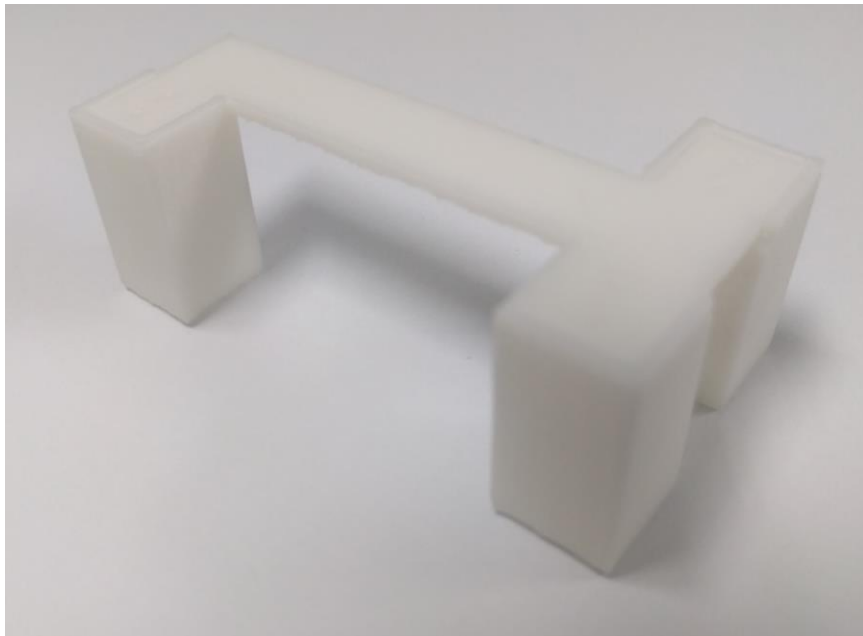


그림 3. 실제 인쇄물. Detector와 power supply를 연결하고 fused silica 모세관을 꽂은 뒤 이 장치에서 실험을 진행하였다.

그림 2는 실제 이번 실험에 사용했던 장비의 도면이며, 그림 3은 완성된 3D printed CE 장비이다.

위 사진처럼 만들어진 3D printer 조형물에 capillary를 장착하고 Pt electrode를 power에 연결, detector는 optical fiber로 연결하여 최적화된 CE hybrid 3D printed unit을 이용하여 실험을 진행하였다. Capillary를 장착하기 전 먼저 run buffer로 capillary를 채운 후, syringe 혹은 gravity injection을 통해 acceptor phase를 미량 주입한 뒤 3D printer unit에 장착한다. 2차 년도에 진행한 것과 다르게 이번에는 시료를 종이에 묻혀 run buffer reservoir에서 HS-ITME를 이용하여 주입, 실제 시료에 적용할 수 있도록 실험을 진행한다. 시료 주입 후 paper를 제거하고, run buffer reservoir에 run buffer를 채우고 Pt electrode를 통해 전압을 공급하여 electrophoresis를 진행한다. 이후 detector를 이용하여 검출, 확인한다.

이 장비로 실험 및 검증 작업 이후 작업의 편의성을 위한 추가 모델링을 진행 및 작성하였다.

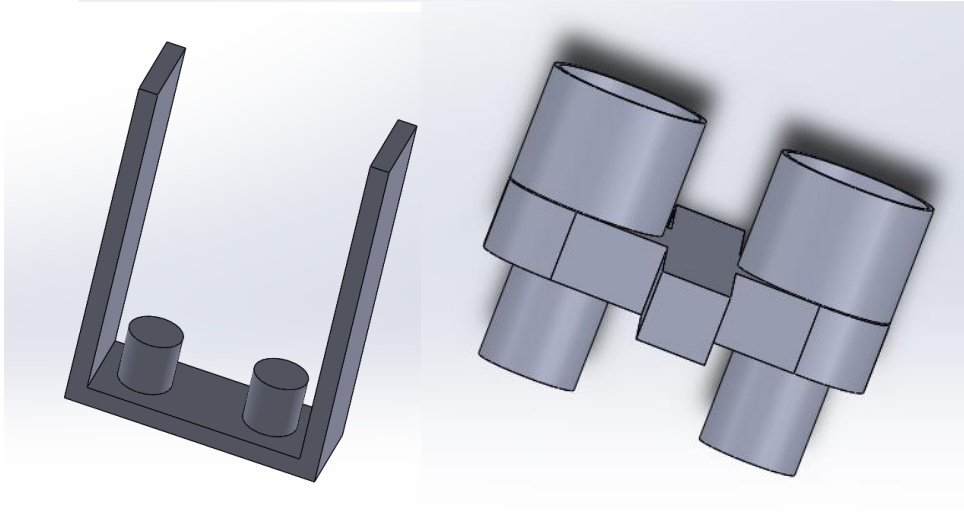
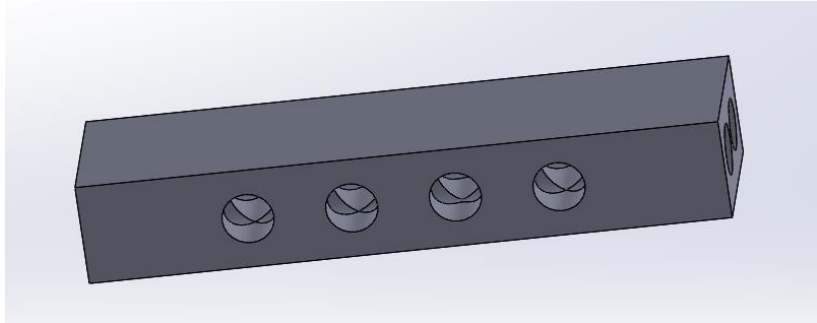
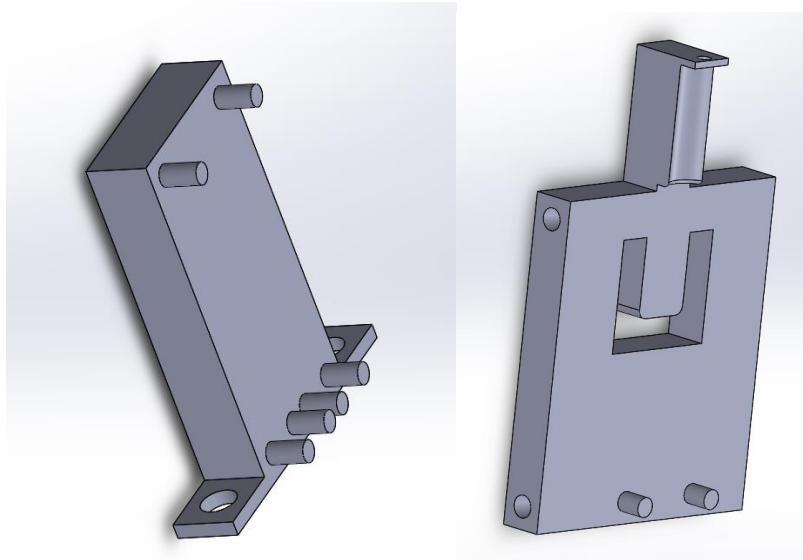


그림 4. 추가 작업의 편의성을 위하여 수정한 모델



그림 5. 4 제품의 인쇄 후 조립 모습.

그림 4은 이후 수정 실험에서 이용하였던 장비의 도면이며, 그림 5는 조립 후 완성된 도면의 모습이다.

위 사진처럼 만들어진 3D printer 조형물에 capillary를 장착하고 Pt electrode를 power에 연결하여 모세관과 전극을 위쪽 고무에 연결하였으며, detector는 상용 homemade UV detector를 이용하였다. HS-ITME가 간단하게 진행되게 하기 위하여 바이알 두개를 이용하여 가운데 레버를 옮겨주어 모세관의 이동 없이 간단하게 실험이 진행될 수 있도록 진행하였다. 기존 장비는 재질의 문제로 HS-ITME 도중 밀폐된 용기를 사용할 수 없었으나 이 모델에서는 시중에서 사용중인 유리로 된 바이알을 사용함으로써 plastic wrap으로 밀봉할 수 있게 하여 실험의 효율성을 증대시켰다. Capillary를 장착하기 전 먼저 run buffer로 capillary를 채운 후 3D printer unit에 장착한다. Sample vial에는 HCl에 녹인 시료를 1 mL 넣고 이후 run buffer vial에는 실험에서 이용할 run buffer를 채워준다. 이후 10분간 기다린 후 중앙 레버를 아래로 당겨 오른쪽으로 이동시키면 두 개의 vial의 위치가 바뀌게 되어

run buffer가 capillary쪽에 위치하게 된다. 이후 전압을 걸어 간편하게 electrophoresis를 진행한다.

### 3.3. 검출기

검출은 기존에 사용하는 상용화된 UV lamp를 광섬유를 이용하거나 다른 detector를 이용하여 키트 내부에 삽입 후 측정을 진행한다. Headspace extraction 방식으로 농축하여 사용하는 것이 가능해지면 현장에서 법정기준치를 만족하는 고감도의 검출을 진행하는 데 도움이 될 것이다.

3D-printed 키트를 소형화하며, 검출기의 부분을 휴대가 용이하게 소형화하는 과정도 매우 중요한 과정의 하나이다. 시료의 검출을 위해서는 검출기가 필수적으로 도입되며, 먼저 optic을 사용한 구조를 확인해 보면 상용화된 UV lamp는 상당한 전력의 공급과 크기, 무게가 휴대하기 불편하다는 단점을 가진다. 이를 해결하기 위하여 연구에서는 여러 가지 광원과 이를 측정할 수 있는 검출기를 도입하기 위해 선행 조사 및 연구를 진행하였다.

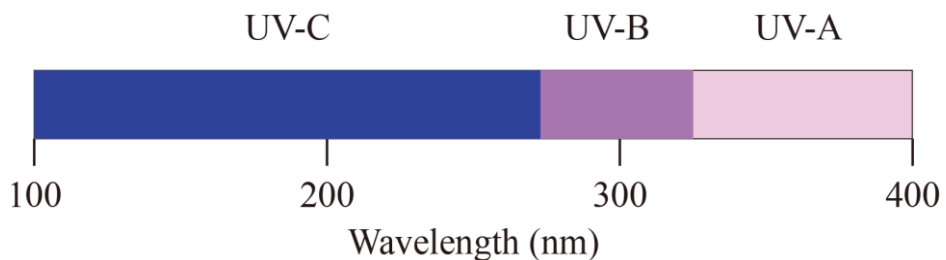


그림 6. UV 영역의 구분

실험에 사용할 Chlorophenol의 흡광 파장은 약 200~220 nm에서 높은 흡광정도를 보인다. 상당수의 LED나 휴대 가능한 UV lamp는 UV-A와 UV-B의 영역으로 본 연구에서 사용하고자 하는 UV-C의 영역과는 거리가 있다. UV-C의 경우, 254 nm의 UV lamp를 많이 찾을 수 있는데, 이는 수은을 이용한 lamp로, 수은의 발광 파장이 254



nm임을 이용한다. Hollow cathode lamp를 사용할 경우, 각각의 물질에 따라 원하는 파장에서의 광원을 얻을 수 있다. 또한 요즘 연구되고 있는 excimer lamp 역시 특정 파장에서의 광원의 세기가 강하여 본 연구에서 이용이 가능할 것이라 판단하였다. 다음은 본 연구에서 사용 가능한 여러 광원에 대한 표이다.

표 6. 광원의 종류

종류	타입	파장 (nm)
Cd	Hollow-cathode	228.80
Se	Hollow-cathode	196.03
Zn	Hollow-cathode	213.86
Xenon	Discharge	185-2000
D <sub>2</sub>	Discharge	165-400

일반적인 휴대용 검출기의 경우, photodiode를 이용하여 광원의 세기를 측정하는 경우가 많다. 그러나 본 연구의 문제점인 적합한 파장을 보이는 광원이 한정되어 있듯이 UV-C의 경우, 검출기 역시 한정되어 있다. 상용화된 photodiode의 경우, 최소 측정 가능 파장은 280 nm 정도로 특수한 검출기가 필요하다. 본 연구에서는 Si photodiode, Si APD 등의 여러 특수 검출 장비를 사용하기 위한 조사를 진행하였다. 다음은 UV-C 영역의 파장을 검출할 수 있는 검출기의 종류이다.

표 7. 파장에 따른 검출기의 종류

종류	파장 (nm)
Si photodiode	190-1000
Si APD (avalanche photodiode)	200-1000
GaP photodiode	190-550
CCD	165-1100
PMT	185-710

다른 검출 방법으로는 간접 검출(indirect detection) 방식이 있다. 이것은 흡광도가 높지 않은 시료를 분석할 때 사용되는 방식인데, 시료에 의해 용액의 흡광도가 높아지는 것이 아닌 낮아지는 것을 이용하는 방법이다. 이를 위해서는 전개 완충용액에 충분한 흡광도를 가지는 co-ion을 첨가해주면 된다. 시료가 존재하는 구간에서는 전하 균형을 위해서 흡광도가 높은 이온들이 더 낮은 농도로 존재하게 되고, 이에 따라 흡광도가 줄어드는 것을 보아 시료를 검출할 수 있다. 간접 검출 방식은 CE에서 흔히 쓰이는 방식이며, HS-ITME 방법에서 사용할 조건과 비슷한 조건에서 간접 검출 방식으로 시료를 분석한 사례는 이미 존재한다.

그러나 위 검출기와 광원을 사용하여 장비를 소형화시키고 고정하는 데에 여러 문제가 있었다. Optical fiber를 통해 나온 빛을 focusing하여 50  $\mu\text{m}$  두께의 channel에 통과시켜야 하는데 이 경우 위치가 조금 틀어지거나 다른 방향을 비추는 경우 충분한 감도를 얻지 못하여 실험에 이용할 수 없었다.

추가로 사용 가능한 방법을 찾아 연구를 진행하였다. 먼저 다른 type의 detector를 사용하여 실험을 진행해 보았다. 그 방법중 하나인 conductivity detection을 이용하였다. 여러 가지 conductivity detection 방법이 있으나 그중 많이 쓰이면서도 장비에 적용하기 용이한

capacitively coupled contactless conductivity ( $C^4D$ )를 이용한 detection을 준비, 진행하였다.

$C^4D$ 란, 시료와의 직접적인 접촉 없이, 시료의 전도도를 측정하는 분석 방법의 이름이다. 일반적인  $C^4D$ 의 센서는 두 개의 전극으로 이루어져 있다. 원통형으로 된 두 개의 전극으로 약간의 간격을 두고 모세관을 감싼다. 이 구조에서 모세관 속의 액체는 저항을 가진 도체로 작용하고, 모세관 속의 액체와 검출기의 전극은 모세관이라는 절연체로 이격되어 있어 일종의 축전기로 작용한다. 이때의 전기적 회로를 모식도로 그려보면 다음과 같이 두 개의 축전기 사이에 가변저항이 연결된 회로로 표현할 수 있다.

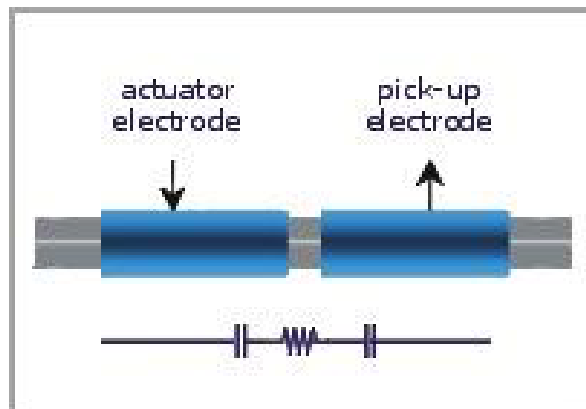
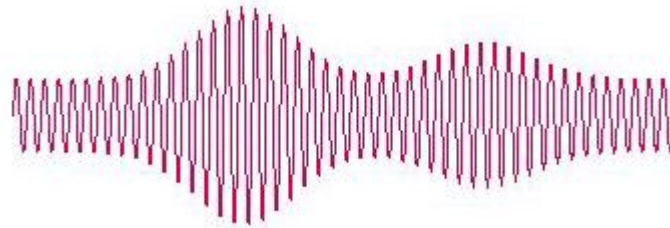


그림 7. Capacitively-coupled contactless conductivity detector

실제로  $C^4D$ 를 이용해 분석하려면  $C^4D$  detector의 몇 가지 변수를 설정해 주어야 한다. 첫 번째로는 센서에 걸리는 AC voltage의 frequency이다. 시료에 따라서 가장 큰 peak를 나타내게 하는 frequency가 있어 무조건 frequency를 높인다고 해서 검출 감도가 높아지는 것은 아니다. 두 번째로는 센서에 걸리는 AC voltage의 크기이다. 기본적으로 센서에 걸리는 전압이 커질수록 induced AC signal도 같이 커진다. 그 외에도 gain과 offset 설정을 해 주어야 한다. Gain은 받아들이는 모든 signal을 증폭하는 비율에 관한 변수이고, offset이란 기준값을 설정해 신호를 기준값과의 오차로 계산해

저장하는 변수이다.



AC signal



DC voltage convert

<http://www.edaq.com/c4d-contactless-conductivity-introduction>

그림 8. AC signal - DC voltage convert

C<sup>4</sup>D를 이용하여 전도도의 변화를 측정하면 UV absorbance가 작은 무기 음이온과 양이온 측정에 효율적으로 적용 가능하며 낮은 detection limit을 가진다. 실험의 분석은 C<sup>4</sup>D에서 나온 데이터를 이용하였다.

그러나 이후 연구 과정에서 C<sup>4</sup>D detector의 검출 감도가 너무 낮아 이용이 불가능하다고 판단하여 capillary electrophoresis에서 이용하는 homemade CE 장비를 이용하여 UV-detection으로 실험을 진행하였다.



그림 9. 실험에 이용한 ECOM ECD 2600 detector

### 3.4. Electrophoresis by 3D printed CE

CE는 실험실에서 제작한 homemade system을 이용하여 실험을 진행하였다. 모세관은 fused silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), 총 길이 40 cm (검출기까지 35cm)에 내경 50  $\mu\text{m}$ , 외경 360  $\mu\text{m}$ 인 제품을 사용하였다. 검출기는 Tracedec C<sup>4</sup>D detector를 이용하여 contactless conductivity detection을 진행하였다. Power supply는 Spellman사의 CZE1000R 을 이용하였다. 실험에 사용된 run buffer는 위 실험에 사용했던 ammonium acetate 20 mM pH 7.7을 사용했으며 실험 전 capillary는 0.1 M NaOH, 물, run buffer로 각 5분씩 전처리 하였으며, 각 실험 사이마다 run buffer로 10분씩 전처리 해주고 진행하였다. 실험에 사용된 전압은 10 kV였으며 온도는 25도로 조절하였다. 위 과정에서 최적화 된 run buffer를 이용하여 실험을 진행하였다.

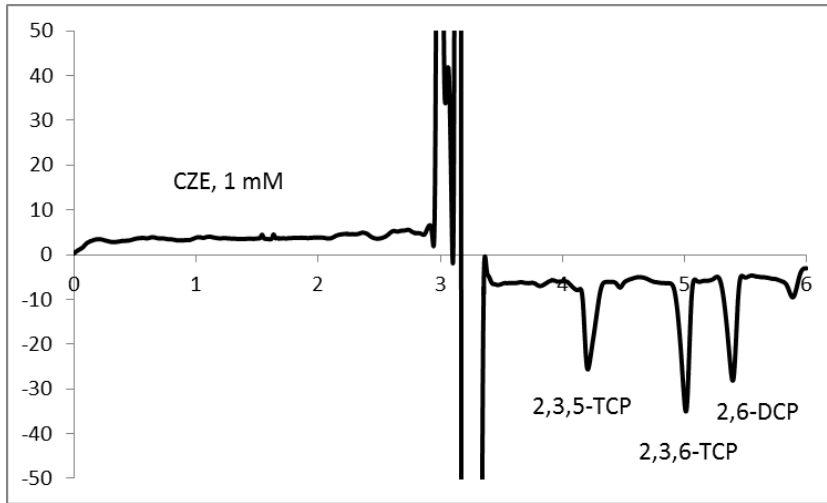


그림 10. CZE 실험 결과. 1 mM 의 chlorophenol sample을 증류수에 녹여 17 cm의 차이를 주고 10초간 주입하였다. 이후 10 kV로 25° C에서 분리하여 C<sup>4</sup>D detector를 이용하여 검출하였다.

그림 10은 1 mM 시료를 이용한 실험 자료를 보여준다. 실험 결과 LOD는 8-12  $\mu$ M였다.

### 3.5. HS-ITME by 3D printed CE

Headspace extraction 이란, 수용액 속의 샘플이 휘발하여 headspace에 도달하고, headspace 내에 노출되어 있는 모세관 내부로 샘플이 농축된다. HS extraction의 장점은 짧은 추출 시간에 비하여 높은 농축 효율을 나타낸다는 것이다. 그 이유는 sample-to-volume ratio와 acceptor drop의 surface-to-volume ratio가 크기 때문이다. 추가적으로 sample clean-up이 가능하다. 또한 샘플을 복잡한 과정을 거치지 않고도 matrix effect를 적게 받으며 분석할 수 있다. 따라서 식수나 토양에 존재하는 미량의 dichlorophenol을 간단하고 효과적으로 분석할 수 있다.

이번 실험에서는 기존 연구를 바탕으로 HS-ITME를 적용, 진행하였다. 먼저 donor sample은 희석된 stock solution을 1 mM

HCl에 녹여 100  $\mu$ M로 만들었다. Chlorophenol은 산성이기 때문에 pKa 보다 낮은 pH 조건에서 대부분 해리되지 않은 중성 상태로 존재하기 때문에 HS로 더 많이 이동할 것이다. Sample donor 1.0 mL을 3d printed buffer reservoir에 담고 시료 손실을 막기 위하여 추출이 끝날 때까지 household wrap을 씌우고 실험을 진행하였다. 추출 시간은 15분으로 진행하였으며, 이는 기존 논문을 바탕으로 산정하였다[5]. 그 결과 EF는 0.6-1.6이었으며, LOD는 9-22  $\mu$ M였다. 각 시료별로 추출 효율에 차이를 보였는데, 그 이유는 run buffer로 추출을 진행했기 때문에 시료들의 pKa마다 이온 상태로 buffer에 존재하는 비율이 다르기 때문이다. 이로 인해 pH 7.7인 buffer 내부에서의 이온 비율이 달라지게 되고 추출 효율에 차이를 보였다.

농축 효율이 너무 낮아서 추가적 조치를 취해 실험을 진행하였다. 먼저 문제가 되는 것은 acceptor phase로 농도가 너무 낮기 때문에 시료를 충분히 extraction 할 수 없다고 판단하여 농도를 높여주었으며, 추출 효율은 온도에 큰 영향을 받기 때문에 온도도 올려 주었다. 추가로 pH를 증가시키기 위해 순수한 NaOH를 acceptor phase로 사용하기로 결정하였다. 기존 결과를 참고하여 acceptor plug으로 0.1 M NaOH를 7.5 nL 주입하였으며, 20분간 60° C에서 추출을 진행하였다.

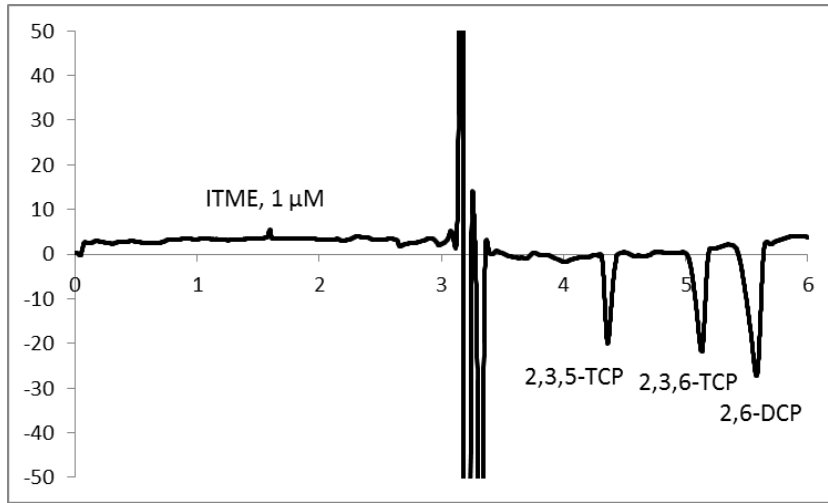


그림 11. HS-ITME 결과.  $1 \mu\text{M}$  의 시료를  $1 \text{ mM}$  HCl에 녹여 doner phase를 만들고 랩을 씌우고 10분간 기다려 HS가 포화 상태가 되도록 한 뒤 capillary를 수면 위  $1 \text{ mm}$ 에 고정시키고 20분간 추출을 진행하였다. 나머지 조건은 그림 10과 동일.

그림 11은  $1 \mu\text{M}$  시료로 추출을 진행한 결과이다. 그 결과 EF가 770-1200으로 높아졌으며 LOD는 9-12 nM 였다. 토양환경센터의 결과를 따르면, 지하수의 수질기준(mg/L)은 1지역 또는 생활용수 기준으로 0.005로 되어있다. DCP의 분자량은 163이며 TCP의 분자량은 197.5이므로, 이 값을 농도로 환산하면 각각 30, 25 nM이다. 이는 위 실험 결과보다 높은 값이며, 이 실험으로 기준 규제 이하의 chlorophenol 화학종 역시 검출 가능함을 알 수 있다.

### 3.6. Paper HS-ITME by 3D printed CE

3D-printed unit는 모세관을 삽입하므로 기존의 CE와 연동이 가능하다. HS-ITME에서는 시료를 증발시켜 관을 통해 직접 받개층이 들어있는 부분으로 추출한다. 마찬가지로, 3D-printed unit에서도 paper에서 증발된 시료는 paper HS part에서 모세관 내의 acceptor로 증발해 농축된다. 상당수의 상공 농축 방법은 단순히 액체의 표면에서의



증발을 이용하나 이는 이번 실험에서 이용하는 3D-printed 키트의 경우 사용이 힘들 것으로 예측하였다. 이번 실험에서 제작하고자 하는 키트의 크기는 상용화된 vial과 비교하여 크기가 크지 않을 것이며, 키트 내부의 상공부 역시 큰 용량을 차지하지 않기 때문이다. 또한, 상공 추출에서 중요한 요인인 액체의 표면적 역시 크지 않아 이를 개선할 수 있는 방법으로 증발을 극대화하고자 다공성 필터 종이를 이용한 실험을 진행하였다.

다공성 필터 종이를 7 mm 타공 펀치를 이용해 원형으로 잘라낸 후 시료 50  $\mu$ L에 충분히 적신 뒤 프린터로 인쇄한 시료 칸의 바닥에 두고 plastic wrap으로 밀봉하여 시료의 유출을 최소화 시켜주었다. 이후 젖은 종이를 sample container에 넣고 랩을 씌우고 5분간 기다려 HS가 포화 상태가 되도록 하였다. 시료 칸은 항온수조를 이용하여 온도를 60° C로 조절하였다. 추출 과정에서 시료 칸으로 capillary 주입구를 이동시키고 20분간 추출을 진행한 뒤 capillary를 run buffer reservoir로 이동시키고 실험을 진행하였다.

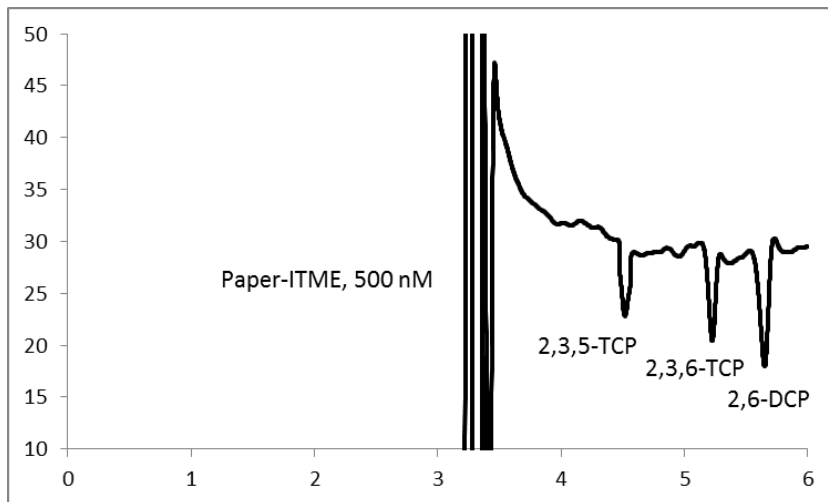


그림 12. Paper HS-ITME 결과. 젖은 종이를 sample container에 넣고 랩을 씌우고 5분간 기다려 HS가 포화 상태가 되도록 하였다. 이후 capillary를 종이 위 1 mm에 고정시키고 15분간 추출을 진행하였다. 나머지 조건은 그림 10과 동일.

500 nM 시료를 이용하여 실험을 진행한 결과는 그림12와 같았다. 이 실험을 통해 paper sample을 이용한 HS-ITME도 성공적으로 수행할 수 있음을 확인하였다. 정량적인 농축비로 CZE와 비교하면 610-930배로 오히려 기존의 HS-ITME보다 조금 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 다공성 종이이므로 증발은 더 빨리 되지만 시료의 절대량이 매우 적기 때문에 추출 한계가 낮은 것으로 판단되었다. 하지만 이 때의 LOD 역시 11-20 nM로 기준치 이하의 농도를 검출 가능한 것을 확인하였다

### **3.7. Run buffer optimize for 3D printed CE with UV detector**

C<sup>4</sup>D detector를 이용한 실험 결과 LOD가 충분히 낮지 않고 noise level이 크다고 판단하여 추가 실험을 진행하였다. 기존의 3d printed unit이 아닌 HS-ITME의 자동화 및 UV detector를 이용한 실험을 진행하며 기존 시료의 TCP, DCP만이 아닌 mono chlorophenol도 추가로 분석하기로 결정, 실험을 진행하였다.

위 실험을 진행하기 앞서 C<sup>4</sup>D detector에서 검출 가능한 조건을 맞추기 위하여 사용하였던 run buffer가 아닌 새로운 run buffer를 선정하는 작업을 진행하였다.

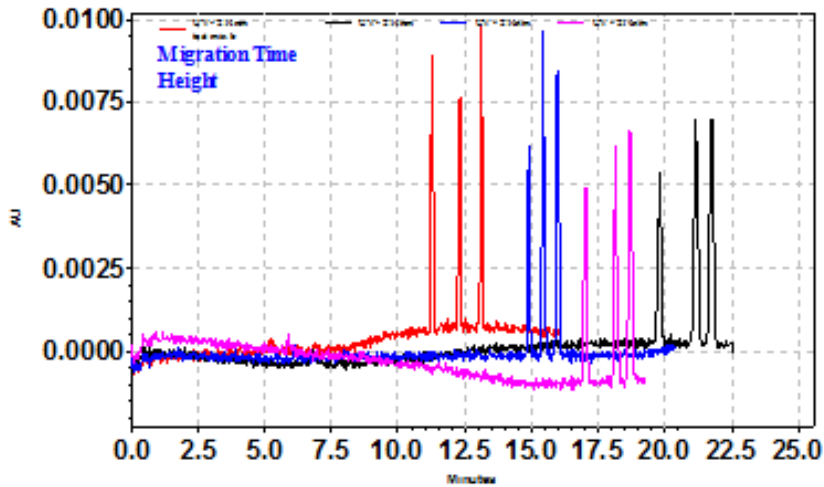


그림 13. 새로운 run buffer와 시료를 기준으로 분리능과 분석 시간을 최적화하였다. 적색: 200 mM borate pH 9.8, sep 23 kV; 청색: 160 mM borate pH 9.8, sep 20 kV; 자색: 200 mM pH 9.8, sep 20 kV; 흑색: 200 mM pH 9.2, sep 23 kV

C<sup>4</sup>D detector에 이용하기 위한 run buffer에는 제약 조건이 많다. C<sup>4</sup>D detector는 conductivity difference를 통해 detection을 하기 때문에 run buffer의 conductivity가 높으면 상대적으로 시료의 conductivity difference가 크지 않게 나타나는 문제가 있다. 그러나 HS-ITME의 경우 run buffer의 농도가 높을수록 추출 효율이 증가하기 때문에 이번 실험에서는 따로 acceptor phase를 이용하여 실험을 진행하였다. 그러나 detector를 UV detector로 변경할 경우 그런 문제를 고려하지 않고 실험을 진행할 수 있으며 훨씬 효율적인 분석이 가능하다. 실험 방법 역시 run buffer를 acceptor phase로 이용할 경우 본 실험에서 제작한 unit을 훨씬 간편하게 제작 및 활용 가능하다.

그림 13은 UV detection에서 이용하기 위하여 새로운 run buffer를 이용하여 분리를 진행한 것이다. 시료는 기존 시료였던 DCP와 TCP 뿐만이 아닌 CP도 추가하여 실험을 진행해 주었다. 그 결과 200 mM borate pH 9.8을 run buffer로 사용하기로 결정하고 실험을 진행하였다.

### 3.8. CZE by 3D printed CE with UV detector

앞서 최적화된 실험 조건을 바탕으로 실제 제작된 unit에서 실험을 진행하였다.

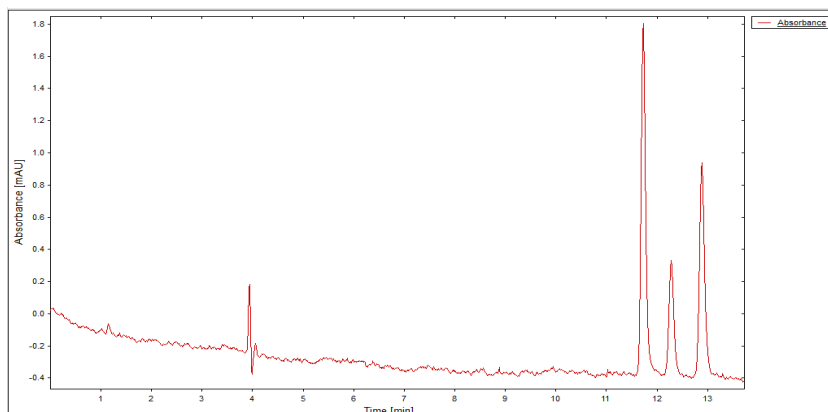


그림 14. CZE 결과. 모세관을 3d printed unit에 장착하고 상용 UV 장비를 이용하여 검출하였다.  $100\ \mu\text{M}$ 의 2,3,6-TCP, 2-CP, 2,6-DCP 세 종류의 chlorophenol sample을 증류수에 녹여 10 cm의 차이를 주고 10초간 주입하였다. 이후 23 kV로  $25^\circ\text{C}$ 에서 분리하여 UV detector를 이용하여 검출하였다. Run buffer는 200 mM borate buffer pH 9.8을 사용하였다.

UV detection을 진행한 결과 기존  $\text{C}^4\text{D}$ 를 이용한 실험에 비해 검출 감도가 훨씬 좋은 것을 확인할 수 있었으며, 높은 농도의 run buffer를 이용하여 ITME 진행 시 따로 acceptor plug을 사용하지 않고 진행할 수 있는 조건에서 분리가 가능함을 확인하였다. 위 실험 결과를 바탕으로 계산한 LOD는 60–170 nM였다. 이후 위 조건을 바탕으로 액체 시료의 HS-ITME를 진행하였다.

### 3.9. HS-ITME by 3D printed CE with UV detector

위 조건을 바탕으로 HS-ITME를 진행하였다. Unit 내부에 스프링으로 상하 움직일 수 있는 장치를 만들고 좌우는 벽을 만들어 틀이 고정되어 움직이도록 하고, 외부에 가이드를 만들어 원하는 방향으로만 이동 가능하도록 제작하고 이 unit을 이용한 실험을 진행하였다.

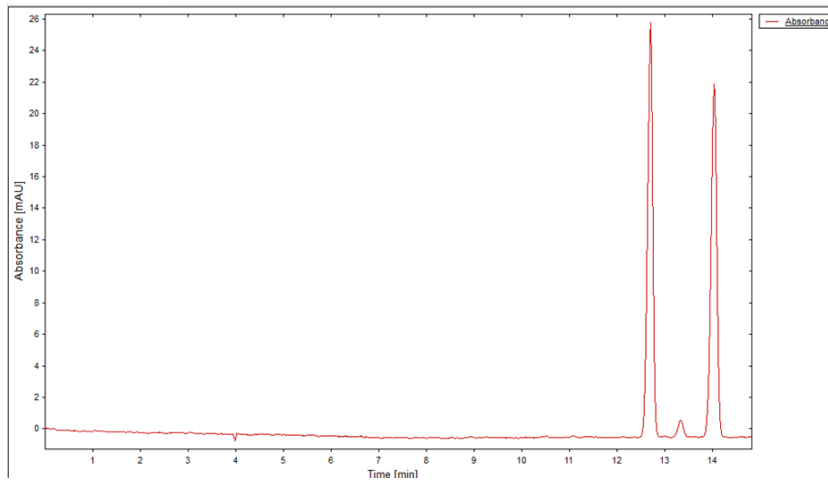


그림 15. HS-ITME 결과. 위에서 제작한 unit을 이용하여 추출을 진행하였다. 20  $\mu$ M 의 2,3,6-TCP, 2-CP, 2,6-DCP 세 종류의 chlorophenol sample을 1 mM HCl 녹여 10분간 추출하였다. 다른 조건은 그림 14와 동일함.

이후 위 장치를 이용하여 추출을 진행한 결과 실험을 성공적으로 수행할 수 있었다. EF는 2,3,6-TCP가 140, 2-CP가 12, 2,6-DCP가 150이 나왔으며 LOD는 2,3,6-TCP가 0.4 nM, 2-CP가 13 nM, 2,6-DCP가 0.6 nM가 나왔다. 2-CP의 경우 현재 run buffer의 pH와 pKa가 비슷하여 다른 시료에 비해 추출 효율이 낮았으나 TCP와 DCP의 경우 매우 효율적인 추출 효율을 보였으며 이는 기준치인 DCP 30 nM, TCP 25 nM보다 매우 낮은 수치로 효과적으로 실제 분석에 적용 가능한 것을 보여준다.

## Chapter 4. Conclusion

이번 실험을 통해 3D printer를 이용한 miniaturize CE unit을 성공적으로 제작할 수 있었고, 이를 통한 paper HS-ITME도 성공적으로 수행 가능했다. 위 방법을 실제 시료에 적용시 기존 방법에 비해 훨씬 빠르고 편리하게 분석할 수 있을 것이며 휴대성으로 인한 POC 역시 가능할 것이다. 종이를 이용한 시료 분석도 시도해 보았으나 기존의 HS-ITME에 비해 개선된 효과를 볼 수는 없었다. 그러나 액체 시료의 양이 충분하지 않을 때는 매우 효율적으로 사용할 수 있을 것이다. 이후 UV를 이용한 시료 분석도 진행하였으며, 이는 기존 homemade setting에 비해 제작이 용이하며 공간을 효율적으로 사용할 수 있는 장점이 있으며 필요할 때 원하는 모양대로 쉽게 modify 할 수 있는 장점을 가지고 있다.

## Bibliography

- [1] K. Choi, Y.G. Jin, D.S. Chung, In-line coupling of two-phase single drop microextraction and large volume stacking using an electroosmotic flow pump in nonaqueous capillary electrophoresis, *J Chromatogr A* 1216(37) (2009) 6466–6470.
- [2] W.H. Gao, G.P. Chen, Y.W. Chen, N.N. Li, T.F. Chen, Z.D. Hu, Selective extraction of alkaloids in human urine by on-line single drop microextraction coupled with sweeping micellar electrokinetic chromatography, *J Chromatogr A* 1218(33) (2011) 5712–5717.
- [3] G. Liang, K. Choi, D.S. Chung, Double sample preconcentration by in-line coupled large volume single drop microextraction and sweeping in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 30(11) (2009) 1953–7.
- [4] S.T. Park, J. Kim, K. Choi, H.R. Lee, D.S. Chung, Headspace-single drop microextraction with a commercial capillary electrophoresis instrument, *Electrophoresis* 33(19–20) (2012) 2961–8.
- [5] H.R. Lee, S.M. Cho, J. Kim, D.S. Chung, Novel and simple headspace in-tube microextraction coupled with capillary electrophoresis, *J Chromatogr A* 1346 (2014) 117–22.
- [6] G. Chen, Y. Lin, J. Wang, Monitoring environmental pollutants by microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Talanta* 68(3) (2006) 497–503.

## Abstract

# Headspace in-tube microextraction of chlorophenols using a capillary inserted 3D- printed electrophoresis unit

Lee Ho Gyun

Analytical Chemistry, School of Chemistry

The Graduate School

Seoul National University

We fabricated a capillary-inserted 3D-printed electrophoresis unit for headspace in-tube microextraction (ITME) using a liquid plug inside the separation capillary as an acceptor phase. For a simple analysis we chose the run buffer of electrophoresis as the acceptor plug. Chlorophenols were enriched about 12–150 times through a 10-min ITME of a sample acidified by 0.1 M HCl at room temperature using the borate run buffer of pH 9.8 as the acceptor phase.



Keywords : 3D printer, Chlorophenol, Headspace extraction, in-tube  
microextraction

Student Number : 2014-21238