creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

dCollection

약학석사학위논문

SPE 흡착제로서 화분립을 이용한 phenolic acids 분석법 개발 및 RSM을 이용한 최적화

Pollen grain as a novel SPE sorbent for determination of nine phenolic acids and optimization using RSM

2015년 8월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
조 혜 윤

SPE 흡착제로서 화분립을 이용한 phenolic acids 분석법 개발 및 RSM을 이용한 최적화

Pollen grain as a novel SPE sorbent for determination of nine phenolic acids and optimization using RSM

지도교수 권성원

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2015년 6월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

조 혜 윤

조혜윤의 약학석사학위논문을 인준함

2015년 6월

위 원 장	**박 정 일**	(인)
부 위 원 장	**송 준 명**	(인)
위 원	**권 성 원**	(인)

국 문 초 록

방해 물질 제거와 목적 분석물의 농축을 위해 주로 이용되는 샘플 전처리 방법은 liquid-liquid extraction (LLE) 또는 solid phase extraction (SPE) 이다. SPE는 유기 용매의 소모가 적다는 면에서 유용한 분리 방법이다. 일반적으로 sorbent material은 SPE에 있어 중요한 요소이다. Conventional SPE materials는 가격이 비싸고 silica를 기반으로 한다. Silica는 안정하여 분해되기 어렵기 때문에 환경에 해롭다.

최근 독성이 적고, 되도록 자연에 가까운 시약을 이용하는 green analytical chemistry에 대한 관심이 높아지고 있다. Pollen grain (화분립)은 수술의 꽃밥 속에 생기는 가루 같은 생식세포로서, 자연에서 얻은 물질이다. Pollen grain의 외막인 exine은 화학적으로 안정하고 다양한 biopolymer로 구성되어있기 때문에 drug delivery에 이용된 바 있다. 본 연구에서는 소나무의 pollen grain을 SPE sorbent로 이용하였다.

식물의 뿌리 삼출물에 포함된 phenolic acids는 토양 속 미생물의 성장에 영향을 미친다. 미생물이 생산하는 allelochemicals는 식물의 생장을 촉진시키거나 저해시킨다. 즉 토양 속 phenolic acids는 식물의 성장에 영향을 미치는 요소 중 하나이다. 본 연구에서는 SPE sorbent로서 pollen grain을 이용하여 토양 속의 phenolic acids를 추출하여 HPLC/UV로 분석하였다.

SPE를 이용한 9종의 phenolic acids 추출 조건은 response surface methodology (RSM)을 이용하여 최적화하였다. 실험 design에 있어서는 central composite design (CCD)를 이용하였다. RSM 결과 추출 최적 조건은 precondition 물의 비율 11%, elution 물의 비율 21%, elution formic acid의 비율 4.5%였다. RSM을 통한 예측값과 위의 최

적 조건하에 3회 반복 실험 후 결과값을 비교한 결과 높은 일치성을 보여주었다.

본 연구의 결과 실험 조건의 정확한 최적값 도출 및 실험 factor와 response의 관계 등을 파악하는데 있어 RSM을 이용하는 것이 효과적임을 확인하였다. RSM을 이용하면 최소한의 실험 횟수로 ANOVA와 같은 통계 처리를 통해 효율적이고 과학적인 방법으로 최적값을 찾을 수 있다.

주요어: Phenolic acids, SPE (solid phase extraction) sorbent, Pollen grain, Green analytical chemistry, Response surface methodology (RSM), Central composite design (CCD), Analysis of variance (ANOVA)

학번: 2013-23470

목 차

국문초록 ····· i
목 차 ····· iii
List of Figures ····· iv
List of Tables ····· vi

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험 ····· 10
1. 시약 및 기기 ····· 10
1-1. 시약 및 용매 ····· 10
1-2. 실험 기구 ····· 11
1-3. 분석기기 ····· 12
2. 실험방법 ····· 13
2-1. SPE를 위한 pollen grain의 준비 ····· 13
2-2. 시료 전처리 ····· 14
2-3. RSM을 이용한 실험 design ····· 16

Ⅲ. 결과 ····· 21
1. SPE 조건의 최적화 ····· 21
2. RSM model에 의한 예측값의 확인 ····· 28

Ⅳ. 결론 ····· 30

Ⅴ. 참고문헌 ····· 31

Abstract ····· 34

List of Figures

Figure 1. OVAT method와 RSM의 비교 ····· 2

Figure 2. Regular two-level factorial design, CCD, BBD의 도식 (factor가 3개인 경우) 및 Plackett-Burman design ····· 3

Figure 3. 3가지 CCD variety의 도식 (factor가 2개인 경우) ····· 5

Figure 4. 각 DOE의 특징 요약 ····· 9

Figure 5. 9 가지 phenolic acid 표준품의 구조 ····· 14

Figure 6. SPE를 이용한 sampling 과정 ····· 15

Figure 7. 3가지 factor의 이름, 단위 및 범위 ····· 16

Figure 8. 20개 실험 point의 도식 ····· 17

Figure 9. Block 기능 및 CCD option 선택 ····· 18

Figure 10. Response 설정 ····· 19

Figure 11. CCD design matrix 및 responses ····· 22

Figure 12. 분석 결과의 확인 ····· 23

Figure 13. Response와 factor에 관한 이차다항식 ····· 25

Figure 14. Factor A와 factor C에 대한 3D response surface ····· 26

Figure 15. Factor A와 factor B에 대한 3D response surface ····· 27

Figure 16. Factor B와 factor C에 대한 3D response surface ····· 27

Figure 17. RSM model을 통한 최적화 과정 ····· 28

Figure 18. RSM model을 통해 예측된 각 factor의 최적값 및 예측된 response ····· 29

List of Tables

Table 1. Factor 개수에 따른 BBD에서 총 실험 point 개수 ····· 7

Table 2. Factor가 11개 이하인 경우 12 runs Plackett-Burman design. ····· 8

Table 3. LC/UV 분석조건 ····· 20

Table 4. ANOVA 결과 ····· 24

Ⅰ. 서론

방해 물질 제거와 목적 분석물의 농축을 위해 주로 이용되는 샘플 전처리 방법은 liquid-liquid extraction (LLE) 또는 solid phase extraction (SPE) 이다. SPE는 유기 용매의 소모가 적다는 면에서 유용한 분리 방법이다. 일반적으로 sorbent material은 SPE에 있어 중요한 요소이다. Conventional SPE materials는 가격이 비싸고 silica를 기반으로 한다. Silica는 안정하여 분해되기 어렵기 때문에 환경에 해롭다.

최근 독성이 적고, 되도록 자연에 가까운 시약을 이용하는 green analytical chemistry에 대한 관심이 높아지고 있다. Pollen grain (화분립)은 수술의 꽃밥 속에 생기는 가루 같은 생식세포로서, 자연에서 얻은 물질이다. Pollen grain의 외막인 exine은 화학적으로 안정하고 다양한 biopolymer로 구성되어있기 때문에 drug delivery에 이용된 바 있다. Pollen grain은 안정한 biopolymer이며, 입자가 작아 SPE sorbent로 이용될 수 있다. 환경 친화적이고 가격이 저렴하다는 면에서 pollen grain은 기존의 silica를 대체할 획기적인 SPE sorbent로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 소나무의 pollen grain을 SPE sorbent로 이용하였다.

식물의 뿌리 삼출물에 포함된 phenolic acids는 토양 속 미생물의 성장에 영향을 미친다. 미생물이 생산하는 allelochemicals는 식물의 생장을 촉진시키거나 저해시킨다. 즉 토양 속 phenolic acids는 식물의 성장에 영향을 미치는 요소 중 하나이다. 본 연구에서는 SPE sorbent로서 pollen grain을 이용하여 토양 속의 phenolic acids를 추출하여 HPLC/UV로 분석하였다.

SPE를 이용한 9종의 phenolic acids 추출 조건은 response surface methodology (RSM)을 이용하여 최적화하였다. 실험 조건의 최적화에 있어 기존에는 여러 가지 변수 중 1개만 변화시키며 최적값을 구하는 one variable at a time (OVAT) method를 이용하였다. 실험 조건을 변화시켜 여러 번 실험한 후 가장 좋은 결과를 보여주는 실험 조건을 최적 조건으로 결정하는 것이 OVAT method이다. 이 방법은 시간이 오래 걸리며 변수간의 상호 작용이 존재하는 경우 이를 통해 산출된 최적값이 정확하지 않을 수 있다. 반면에 RSM을 이용하면 다변량 통계를 통해 실험 조건 간의 상호작용을 고려할 수 있고, 여러 가지 실험 조건이 동시에 변화할 때의 response (결과)를 파악할 수 있다. RSM을 통해 실험 조건과 response간의 상호작용을 나타내는 model을 구축하고, 구축된 model을 통해 최적의 response를 나타내는 실험 조건을 예측할 수 있다. 또한 예측된 실험 조건 하의 response를 예측

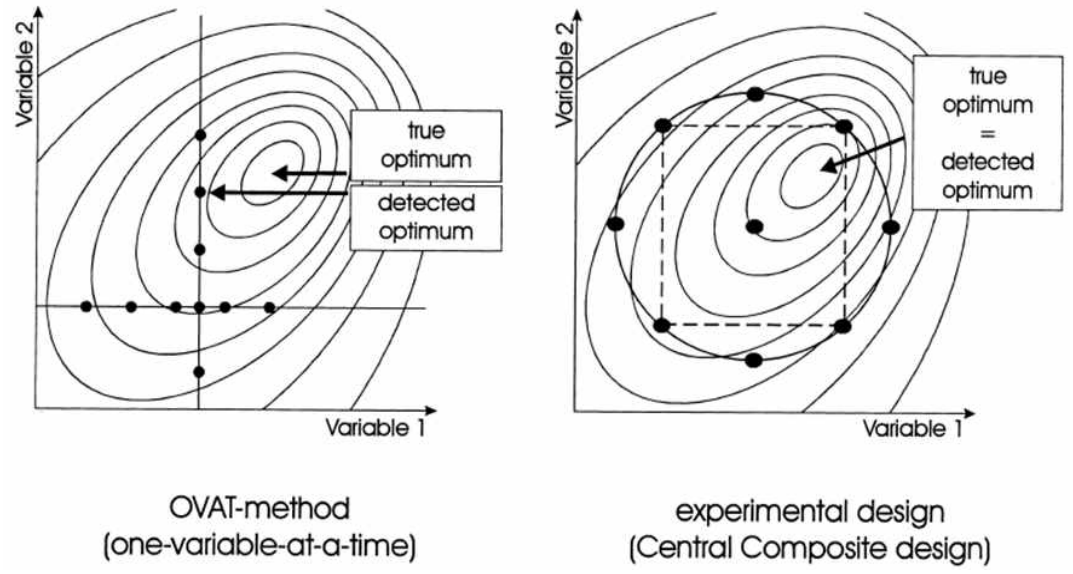

Figure 1. OVAT method와 RSM의 비교
(Preu et al, 1998, JCA)

할 수 있다. Model을 통해 예측된 값은 실제 실험을 수행함으로써 예측에 대한 정확성을 판단할 수 있다. 즉, OVAT method는 수행한 실험결과만을 기반으로 한 결과론적인 방법이라면, RSM은 최소한의 실험과 통계를 기반으로 한 과학적이고 예측론적인 방법이다 (Figure 1).

RSM은 design of experiment (DOE)를 이용한 실험 design을 통해 이루어진다. 주로 이용되는 DOE에는 위의 그림과 같이 4 가지가 있다 (Figure 2). 각 design은 factorial points, star points, center points, midpoints로 구성된다.

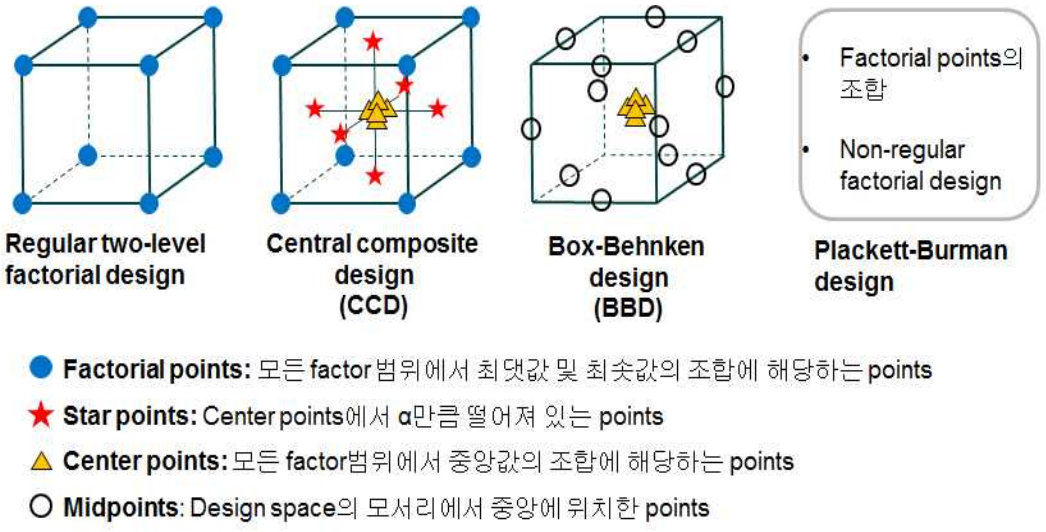

Figure 2. Regular two-level factorial design, CCD, BBD의 도식 (factor가 3개인 경우) 및 Plackett-Burman design

1. Regular two-level factorial design

Regular two-level factorial design은 factorial points로 이루어져 있다. 이 design을 통해 factor의 response에 대한 linear influence, factor간의 상호작용을 알 수 있지만 factor의 quadratic effects는 알 수 없다. 그렇기 때문에 이 design은 예비실험이나 최적화 과정의 초기 단계에 유용하다. 실험 point의 개수 (N_f)는 2^f (f = factor의 개수)이다. Factor의 개수에 따라 실험 point 개수가 지수적으로 증가하기 때문에 보통 factor의 개수가 4개 이하인 경우 이용한다. 신뢰도가 낮은 편이기 때문에 RSM 보다는 screening out의 목적으로 주로 이용된다. Screening out이란 여러 개의 factor 중 중요한 factor를 선택하고, 중요하지 않은 factor를 제거하는 것을 의미한다.

2. Central composite design CCD

Central composite design (CCD)은 factorial points뿐만 아니라 star points와 center points로 구성된다. Star points는 center points에서 +α, -α만큼 떨어진 points로서, response surface의 curvature를 파악하는데 이용된다. 이 points는 factorial points와는 또 다른 새로운 최댓값 및 최솟값 (extreme values)의 조합이며, point의 개수는 factor 개수의 2배에 해당하는 값이다. α값은 다음 식에 의해 결정된다.

$$\alpha = \sqrt[4]{\text{실험}\,point\text{의 개수}} = \sqrt[4]{N_f} = \sqrt[4]{2^f}\ (f = factor\text{의 개수})\ \text{(식 1)}$$

Factor가 2개인 경우 위의 식에 의해 α값은 1.4다.

Center points는 모든 factor 범위에서 중앙값의 조합에 해당하는 points로서, 다른 experimental points와 달리 한 point에서 여러 번 반복된다. Data 분석 시 pure error의 측정에 이용된다. Center point의 개수 (N_o)는 다음 식에 의해 결정된다.

$$\alpha = \sqrt{\frac{\sqrt{(N_f + N_\alpha + N_0)N_f} - N_f}{2}} \text{ (식 2)}$$

CCD의 총 실험 point의 수는 다음 식에 의해 결정된다.

$$N_f = 2^f + 2f + N_0 \text{ (식 3)}$$

Factor 개수가 같을 때 실험 point의 개수가 4개의 DOE중 가장 많다. 실험 point 개수가 많을수록 erroneous points의 영향을 덜 받게 되며 신뢰도가 높은 model이다. 즉 CCD는 4개의 DOE 중 가장 신뢰도가 높은 model이다. CCD를 통해 linear influence, factor간 상호작용, quadratic effects를 파악할 수 있으며, RSM의 목적으로 이용된다.

Star points의 위치에 따라 여러 CCD가 있는데 그 중 face centered, rotatable, inscribed가 주로 이용된다 (Figure 3). 이 중 가장 좋은 variety가 어떤 것인지는 확실하지 않으며 연구의 특성에 따라 이용되는 variety는 다르다. 파악하고자 하는 실험 범위, 적용 가능 여부 등에 따라 적합한 CCD를 선택하여야 한다. α값이 design의 범위를 결정하며, design 범위가 실행 가능 범위에 포함되어야 한다.

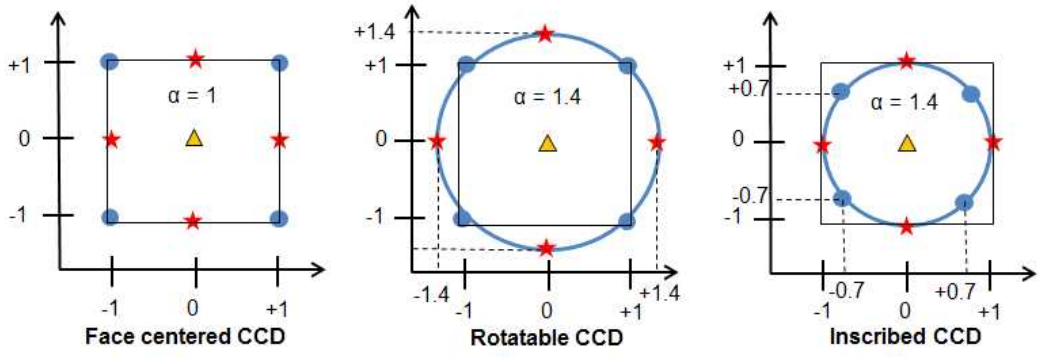

Figure 3. 3가지 CCD variety의 도식 (factor가 2개인 경우)

2-1. Face centered CCD

Face centered CCD는 α값이 1인 경우를 의미한다. Star points는 factor의 축에 평행하고, center point로부터 1만큼 떨어진 지점에 위치한다. Figure 2에 나타낸 CCD는 face centered CCD이다. Design space는 figure 3와 같이 factor가 2개인 경우에는 정사각형을, figure 2와 같이 factor가 3개인 경우에는 정육각형을 이룬다.

2-2. Rotatable CCD

Figure 3과 같이 factor가 2개인 경우 α값은 1.4다. Star points는 factor 축에 평행하고, center point를 원점으로 하여 반지름이 1.4인 지점에 위치한다. Design space는 figure 3와 같이 factor가 2개인 경우에는 factorial points로 이루어진 정사각형의 꼭짓점을 지나는 원형을, factor가 3개인 경우에는 정육각형의 꼭짓점을 지나는 구형을 이룬다. Rotatable CCD는 face centered CCD에 비해 α값이 크고, 그에 따라 design의 범위가 확장된다.

2-3. Inscribed CCD

Inscribed CCD 또한 factor가 2개인 경우 α값은 1.4다. 그렇지만 star points가 factor 범위의 최댓값, 최솟값에 위치하고, factorial points는 design space의 안쪽으로 옮겨진다. Figure 3와 같이 factor가 2개인 경우 star points는 -1에서 +1의 범위를, factorial points는 -0.7에서 +0.7의 범위에 있게 된다. Design space는 figure 3와 같이 factor가 2개인 경우에는 정사각형에 맞닿아있는 원형을, factor가 3개인 경우에는 정육각형의 각 면에 맞닿아있는 구형을 이룬다. 즉, inscribed CCD는 design 범위가 축소된 rotatable CCD라 할 수 있다.

3. Box-Behnken design (BBD)

Box-Behnken design (BBD)은 CCD와 같이 center points를 갖고 있지만, factorial points대신 midpoints를 가지며 star points는 존재하지 않는다. BBD를 통해 linear influence, factor간 상호작용, quadratic effects를 파악할 수 있으며, RSM의 목적으로 이용된다. Factor 수가 같을 때 CCD에 비해 실험 point의 개수가 더 적기 때문에 신뢰도는 더 낮은 편이다. 그렇지만 BBD는 midpoints의 조합이기 때문에 안전한 operating zone을 갖는다. CCD는 factorial points (최댓값 및 최솟값의 조합)와 '정육면체'를 벗어나는 star points를 가지며, 이러한 points는 관심 범위를 벗어나거나 실험을 진행할 수 없는 지점일 수도 있다. BBD는 이러한 star points와 factorial points를 갖고 있지 않기 때문에 모든 실험 points가 안전한 operating zone에 포함된다. BBD에서 총 실험 point는 다음과 같다 (Table 1).

Factor의 개수	Center point의 개수	총 실험 point의 개수
3	3	15
4	3	27
5	3	46
6	6	54
7	6	62
9	10	130
10	10	170

Table 1. Factor 개수에 따른 BBD에서 총 실험 point 개수

4. Plackett-Burman design

Plackett-Burman design은 regular two-level factorial design과 같이 factorial points로 이루어져 있다. 그렇지만 모든 factorial points의 조합인 regular two-level factorial design과 달리 Plackett-Burman design은 일부 factorial points의 조합이다. 그렇기 때문에 이 design은 non-regular factorial design 이라고 불린다. Table 2는 factor가 11개 이하인 경우 Plackett-Burman design의 12 runs design이다. 이 표에서 +1은 factor 범위에서 최댓값, -1은 최솟값을 의미한다. 예를 들어 factor가 6개인 경우 Factor G부터 Factor K까지는 비워둔 채 무시하고 실험을 진행하면 된다. Factor가 11개 이상인 경우 20, 24, 28 runs 등의 Plackett-Burman design을 이용하면 된다.

	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E	Factor F	Factor G	Factor H	Factor I	Factor J	Factor K
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1

Table 2. Factor가 11개 이하인 경우 12 runs Plackett-Burman design

Plackett-Burman design에서 main effect들은 factor간의 상호작용과 confound된다. 그렇기 때문에 이 design에서 quadratic effect, factor 간의 상호작용은 파악할 수 없으며 linear influence만 고려된다. 이러한 특징을 갖기 때문에 regular two-level factorial design과 같이

screening out의 목적으로 이용된다.

앞의 내용들을 요약하면 다음 그림과 같다 (Figure 4). 본 연구에서는 신뢰도가 가장 높은 CCD를 이용하여 pollen grain을 이용한 SPE 실험과정을 최적화하였다.

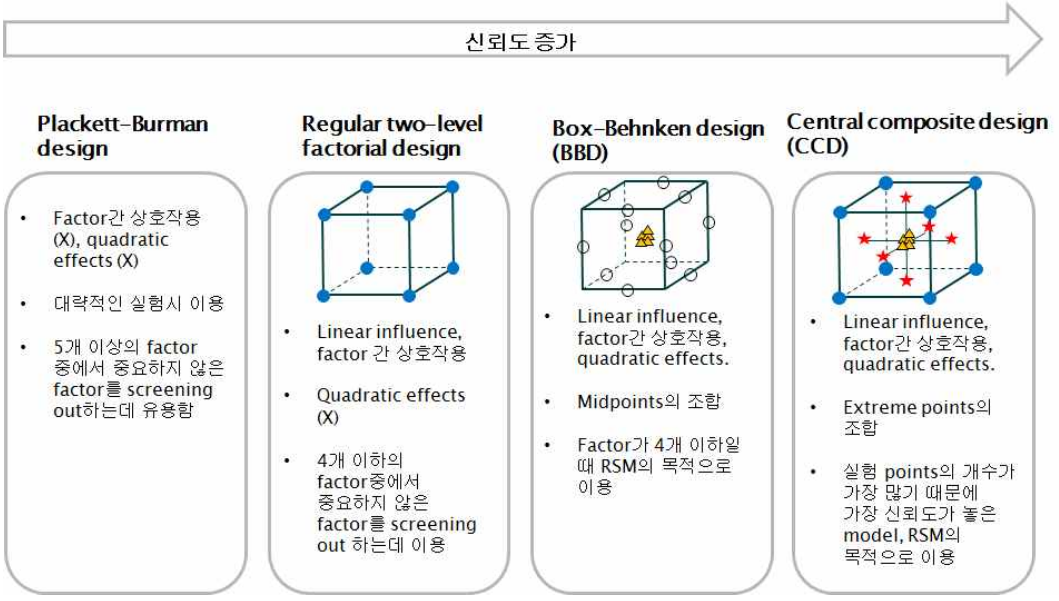

Figure 4. 각 DOE의 특징 요약

Ⅱ. 실험

1. 시약 및 기기

1-1. 시약 및 용매

분석법 확립을 위해 9종의 phenolic acids 표준품을 사용하였다.

- Gallic acid (Sigma Aldrich, USA)
- 3,4-Dihydroxybenzoic acid (Sigma Aldrich, USA)
- 4-Hydroxybenzoic acid (Sigma Aldrich, USA)
- Vanillic acid (Sigma Aldrich, USA)
- Caffeic acid (Sigma Aldrich, USA)
- p-Coumaric acid (Sigma Aldrich, USA)
- Ferulic acid (Sigma Aldrich, USA)
- Sinapic acid (Sigma Aldrich, USA)
- m-Coumaric acid (Sigma Aldrich, USA)

Pollen grain을 SPE sorbent로서 이용하기 위해 washing하고, 토양에서 phenolic acids를 추출하기 위해 다음과 같은 용매 및 시약을 사용하였다.

- Pollen grain (Han Science, Korea)
- Water (J.T. Baker, USA)
- Methanol (J.T. Baker, USA)
- Acetonitrile (J.T. Baker, USA)

- Ammonia (Sigma Aldrich, USA)
- Formic acid (Sigma Aldrich, USA)

LC/UV 분석을 위해 다음과 같은 용매 및 시약을 사용하였다.

- Water (J.T. Baker, USA)
- Acetonitrile (J.T. Baker, USA)
- Formic acid (Sigma Aldrich, USA)

1-2. 실험 기구

- Adjust pipette (0.5~10 μL, 20~200 μL, 100~1000 μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Pipette tips (0.5~10 μL, 20~200 μL, 100~1000 μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge tube (2.5 mL, 5 mL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Conical tube (15 mL, SPL Life Sciences Co. Ltd)
- Vortex Mixer (Vortex Genie 2)
- Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- PTFE membrane filter (0.2 μm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany)
- Liquid nitrogen
- Volumetric falsk (100 mL, 500 mL, Schott Duran, Germany)
- Filtration Tubes 3 mL (SUPELCO, USA)

1-3. 분석 기기

- HPLC: PerkinElmer UHPLC (PerkinElmer, USA)
- Column : SPP column (C18, 2.1 X 150 mm, 2.7 μm, Agilent, USA)
- Detector : PerkinElmer PDA (PerkinElmer, USA)

2. 실험방법

2-1. SPE를 위한 pollen grain의 준비

Pollen grain을 SPE sorbent로 이용하기 위해서는 washing 과정이 필요하다. Pollen grain을 Soxhlet extractor에 담은 뒤 MeOH (methanol)을 24시간 동안 환류하였다. 이 과정을 통해 pollen grain의 색소와 지방이 제거되었다. 환류를 마친 후, ACN (acetonitrile) : H_2O : FA (formic acid) (67 : 30 : 3, v/v)용액으로 washing을 하였다. 이 과정을 통해 탄수화물이 제거되었다. 2번의 washing과정을 마친 후, 60 ℃에서 12시간동안 건조하였다. 건조가 끝난 pollen grain은 유발 유봉을 이용해 뭉쳐있는 덩어리들을 갈아 입자를 작게 하였다. 이를 400 mg씩 정밀하게 달아 SPE cartridge를 만들었다.

2-2. 시료 전처리

9가지 phenolic acid 표준품의 경우 (Figure 5), 저울로 정밀하게 측정한 표준품을 5 mg/mL의 농도로 MeOH에 녹여 저장용액을 만들었다. 저장용액을 필요한 양만큼 옮긴 뒤 MeOH을 증발시키고 남은 표준품을 0.5% NH_3 in ACN에 녹였다.

다음의 과정을 통해 토양에서 phenolic acids를 추출하였다. 2 g의 토양을 취해 6 mL의 MeOH : H_2O (1 : 1, v/v) 혼합액을 넣었다. Ultrasonication을 40 ℃에서 1 시간동안 진행하여 토양에서 phenolic acids를 추출하였다. 용액 내에 불용성 불순물을 제거하기 위하여 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. Supernatant를 PTFE 0.2 μm membrane filter로 한 번 더 불순물을 제거한 후 따로 4 mL 취하였다. 따로 취한 용매를 50 ℃에서 nitrogen purge를 이용하여 증발시켰다. 이를 1.5 mL의 0.5% NH_3 in ACN 용액에 녹였다.

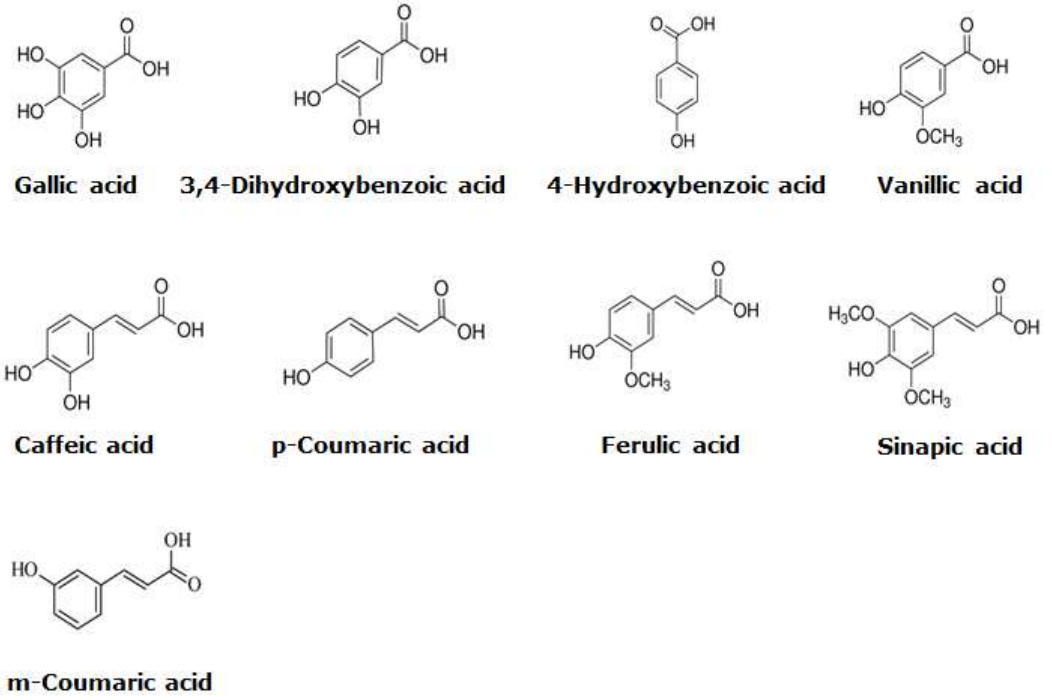

Figure 5. 9 가지 phenolic acid 표준품의 구조

SPE를 이용한 sampling 과정은 다음과 같다 (Figure 6). 물과 ACN 혼합 용액 2 mL와 ACN 2 mL을 이용해 precondition 하였다. 이 과정에서 물과 ACN 혼합 용액을 통해 -OH group을 가진 pollen grain 표면에 물 층이 생성되고, ACN을 통해 그 외에 남은 물이 제거된다. Precondition 후, 1 mL의 시료 또는 표준품을 spike한 1 mL의 시료를 통과시켰다. 이 때 시료의 소수성 방해물은 SPE cartridge 밖으로 빠져나가고, phenolic acids는 pollen grain 표면의 물 층에 분배되어 SPE cartridge에 남는다. 또한 ACN 1 mL를 이용해 cartridge에 남아 있는 소수성 방해물을 제거하였다. SPE cartridge에 남아 있는 phenolic acids를 용리시키기 위해 3 mL의 ACN, 물, FA의 혼합 용액을 이용하였다. 용리액은 50 ℃에서 nitrogen purge를 이용하여 증발시켰다. 이를 200 μL의 물에 녹인 후, PTFE 0.2 μm membrane filter로 불순물을 제거하여 HPLC에 injection하였다.

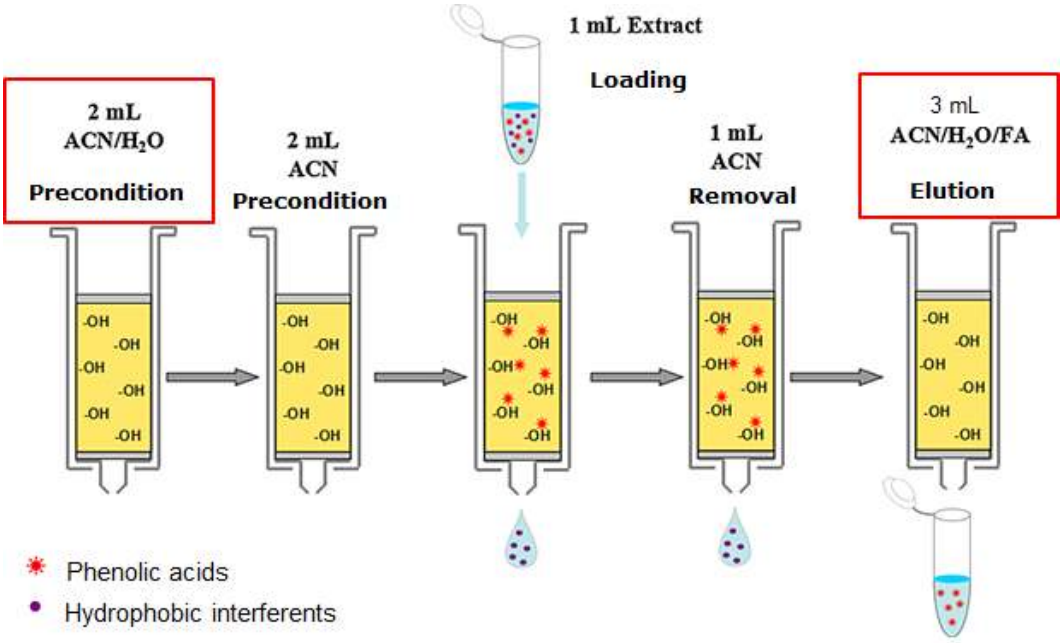

Figure 6. SPE를 이용한 sampling 과정
(Qian Lu et al, 2014, JCA)

2-3. RSM을 이용한 실험 design

SPE를 이용한 sampling 과정을 최적화하기 위하여 Design-Expert (trial, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA) software를 이용하였다. 실험 원리 및 예비 실험 결과를 통해 최적화할 실험 조건 3 가지를 결정하였다. Figure 6에서 precondition과정과 elution과정은 phenolic acids의 흡착 및 용리에 중요한 영향을 미치기 때문에 다음 3 가지 실험 조건을 최적화할 실험 조건으로 결정하였다.

-Factor A: precondition시 물의 비율
-Factor B: elution시 물의 비율
-Factor C: elution시 FA의 비율

위의 세 가지 조건을 CCD를 이용해 최적화하였다. 예비 실험을 통해 factor A, B, C의 범위를 각각 10 - 30, 10 - 30, 0 - 5로 설정하였고 이를 software에 다음과 같이 입력하였다 (Figure 7).

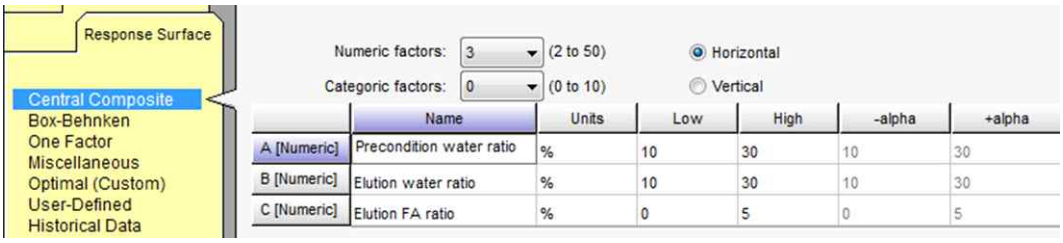

Figure 7. 3가지 factor의 이름, 단위 및 범위

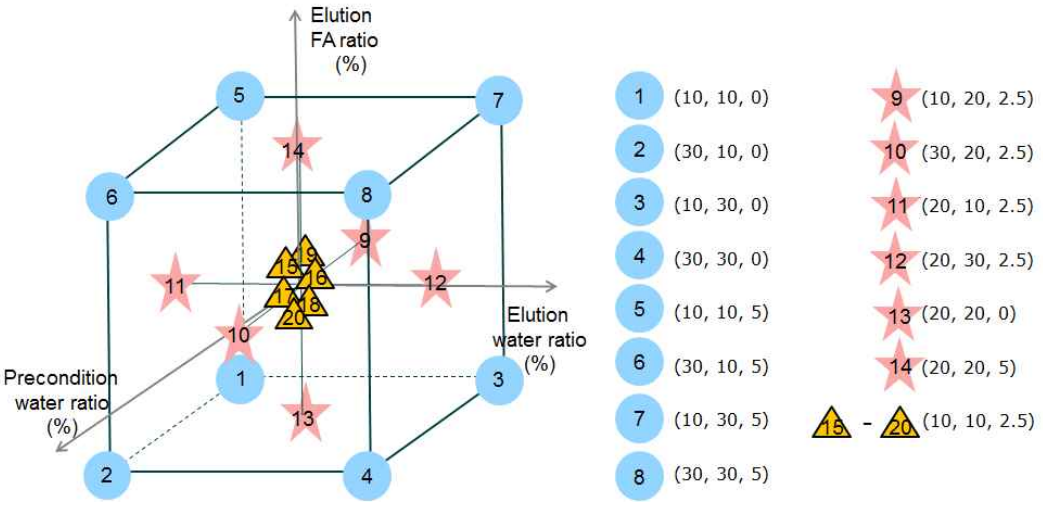

Figure 8. 20개 실험 point의 도식

식 1, 2, 3에 의해 factor의 개수가 3개인 경우, 총 실험 point의 개수는 20개이다. Figure 2의 CCD 도식에 figure 7의 각 factor에 관한 범위를 대입하여 좌표로 나타내면 figure 8과 같다. 이 20개의 실험 point로 본 실험의 CCD는 구성되며, uncontrolled factors의 영향을 최소화하기 위해 무작위 순서로 실험을 진행하였다.

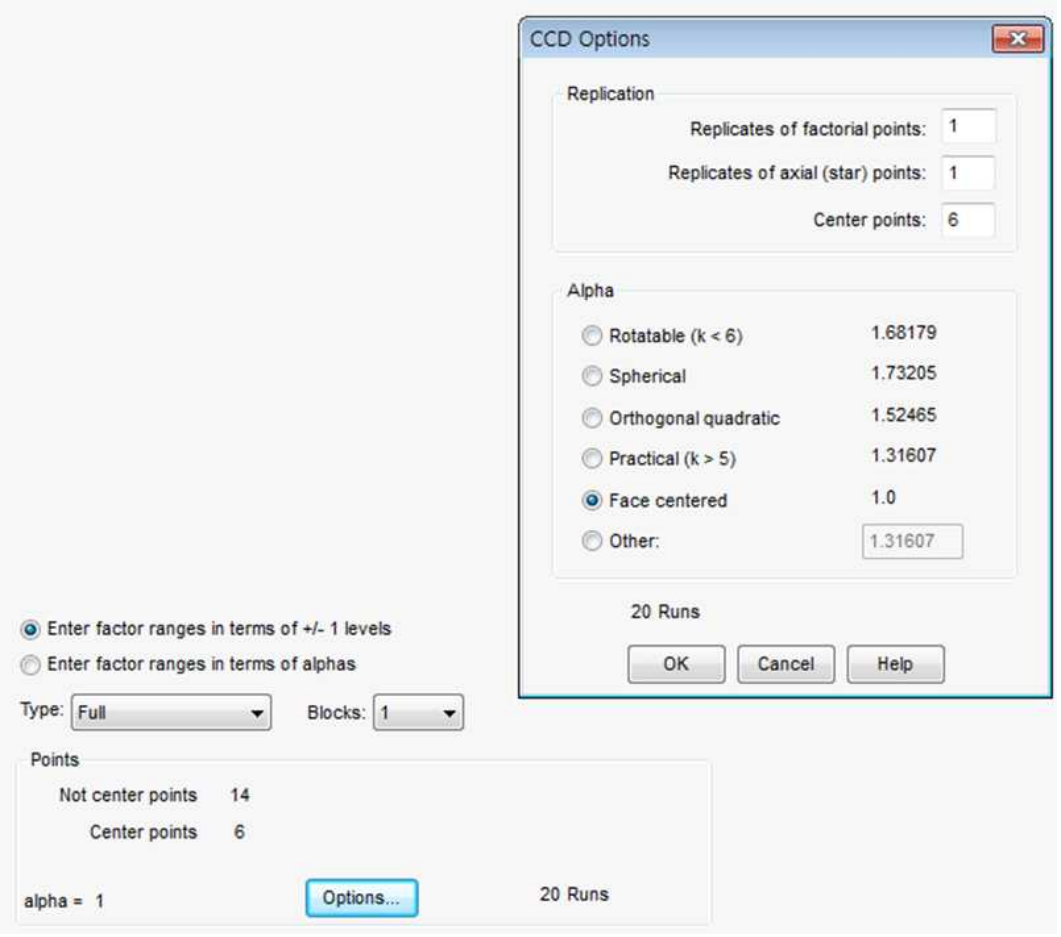

Figure 9. Block 기능 및 CCD option 선택

Block 기능은 실험을 하루 내에 진행할 수 없는 경우, 실험을 며칠에 걸쳐 나눠서 design하는 기능이다. 예를 들어 figure 9의 Blocks를 2로 선택하면, 전체 실험 design을 이틀 동안 실험하도록 design해준다. 그러나 본 실험의 경우 총 실험 개수인 20개의 실험을 하루 동안 모두 진행할 수 있기 때문에 block기능을 이용하지 않았다. 또한 figure 9 아래쪽의 Options를 통해 CCD의 종류를 선택할 수 있는데, 본 실험에서는 face centered를 선택하였다.

그 다음 과정에서 response를 설정하는데, response로서는 9개 phenolic acid의 peak area 총합으로 하였다. Response의 개수는 꼭 1개일 필요는 없으며, 상황에 따라 개수를 선택하고 각 이름을 입력할 수 있다 (Figure 10).

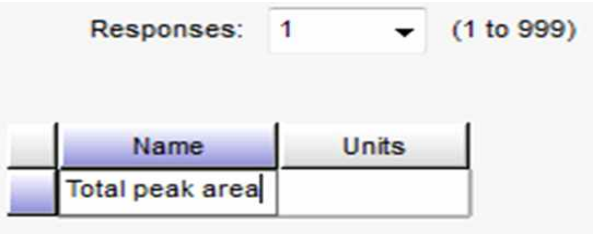

Figure 10. Response 설정

2-4. LC/UV 분석조건

토양에서 phenolic acids를 추출한 시료를 PerkinElmer UHPLC를 사용하여 분석하였다. LC column은 porous한 구조를 가진 SPP column (C18, 2.1 X 150 mm, 2.7 μm, Agilent)를 사용하였다. UV detector는 PerkinElmer PDA를 이용하였다.

LC instrument	PerkinElmer UHPLC
Column	SPP column (C18, 2.1 X 150 mm, 2.7 μm)
Detector	PerkinElmer PDA
Chromatographic conditions	• Solvent A : 0.1% FA in H_2O • Solvent B : 0.1% FA in ACN • Flow rate : 0.2 mL/min

Step time (min)	%A	%B
0.5	90	10
2.0	90	10
25.0	85	15
10.0	50	50
1.0	0	100
10.0	0	100
1.0	90	10
18.0	90	10

Table 3. LC/UV 분석조건

Ⅲ. 결과

1. SPE 조건의 최적화

Design-Expert software에 figure 7의 내용 및 앞에서 설명한 block, option에 관한 내용을 입력 후, response에 관한 정보 까지 입력하면 figure 11과 같은 design matrix를 얻을 수 있다. Figure 11에서 std는 figure 8의 실험 point의 numbering을 의미하고, software는 이를 무작위 순서로 실험할 수 있게 해준다. Figure 11에서 run은 무작위로 배치된 실험 순서에 따른 numbering을 의미한다. 실험 순서는 design을 할 때마다 무작위로 바뀌기 때문에 한번 design matrix table을 얻고 이를 계속해서 사용하려면 꼭 저장해서 사용해야 한다. Run 순서대로 실험을 진행한 후 얻은 response (9개 phenolic acid의 peak area 총합)를 figure 11과 같이 입력하였다.

Std	Run	Factor 1 A:Activatio... %	Factor 2 B:Elution wat... %	Factor 3 C:Elution FA r... %	Response 1 Total peak ar...
10	1	30	20	2.5	2.13807E+007
4	2	30	30	0	1.8826E+007
14	3	20	20	5	2.1837E+007
16	4	20	20	2.5	2.15186E+007
17	5	20	20	2.5	2.17074E+007
5	6	10	10	5	2.26428E+007
19	7	20	20	2.5	2.16989E+007
8	8	30	30	5	1.90074E+007
1	9	10	10	0	1.98987E+007
20	10	20	20	2.5	2.11371E+007
18	11	20	20	2.5	1.89379E+007
7	12	10	30	5	2.25815E+007
9	13	10	20	2.5	2.24992E+007
11	14	20	10	2.5	1.70928E+007
12	15	20	30	2.5	1.93237E+007
13	16	20	20	0	1.90052E+007
6	17	30	10	5	1.77969E+007
2	18	30	10	0	1.66567E+007
15	19	20	20	2.5	1.87987E+007
3	20	10	30	0	2.08217E+007

Figure 11. CCD design matrix 및 responses

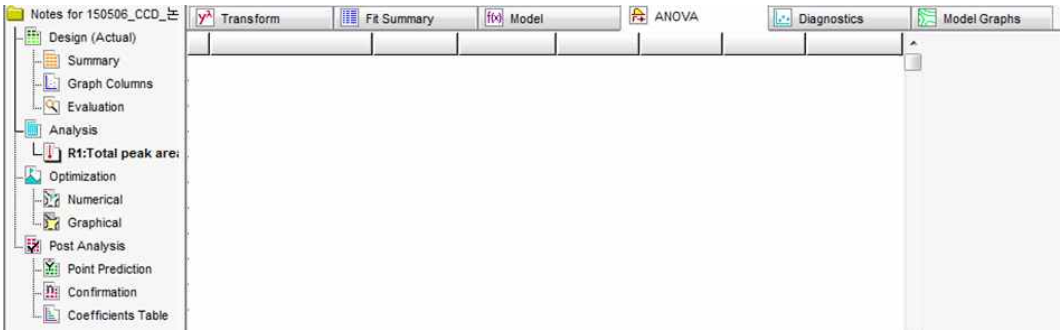

Figure 12. 분석 결과의 확인

Figure 12의 왼쪽에 있는 Analysis를 클릭하면 여러 분석 결과를 확인할 수 있다. Figure 12 위쪽의 Fit summary, Model을 클릭하면 design model에 대한 요약 정보를 확인할 수 있다. 그 결과 실험을 통해 얻은 design model이 quadratic model이라는 것을 알 수 있었다. Figure 12 위쪽의 ANOVA를 클릭하면 analysis of variance (ANOVA) 결과를 확인할 수 있다 (Table 4).

Source[a]	Sum of squares[b]	d.f.[c]	Mean square[d]	F-value[e]	p-value, Prob>F[f]	Significance[g]
Model	6.231E+013	9	6.924E+012	4.79	0.0112	significant
A	2.408E+013	1	2.408E+013	16.66	0.0022	significant
B	6.404E+012	1	6.404E+012	4.43	0.0616	not significant
C	9.079E+012	1	9.079E+012	6.28	0.0311	significant
AB	9.127E+011	1	9.127E+011	0.63	0.4453	not significant
AC	1.297E+012	1	1.297E+012	0.90	0.3658	not significant
BC	6.945E+011	1	6.945E+011	0.48	0.5040	not significant
A^2	7.408E+012	1	7.408E+012	5.12	0.0471	significant
B^2	1.640E+013	1	1.640E+013	11.35	0.0071	significant
C^2	3.511E+010	1	3.511E+010	0.024	0.8792	not significant
Residual[h]	1.445E+013	10	1.445E+012			
Lack of fit[i]	3.832E+012	5	7.664E+011	0.36	0.8563	not significant
Pure error[j]	1.062E+013	5	2.124E+012			
Cor total[k]	7.677E+013	19				

[a] Variation의 source
[b] 편차의 제곱합
[c] 자유도
[d] Sum of squares를 자유도로 나눈 값
[e] 잔차 variance와 term variance를 비교하는 test
[f] Null 가설이 사실일 경우 관찰된 F-value를 얻을 확률
[g] "Prov>F" 값이 0.05보다 작은 경우 유의한 terms로 간주
[h] 실험적 error를 판단하는데 이용된 terms
[i] Fitted model 근처의 data의 variation
[j] 반복된 design points (center points)에서 response의 variation
[k] 모든 정보의 합

Table 4. ANOVA 결과

Model의 F-value 4.79는 model이 유의함을 의미하며, Prob>F값인 0.0112는 위와 같은 높은 F-value가 noise에 의해 나왔을 확률이 1.12%밖에 되지 않는다는 것을 의미한다. Prob>F값이 0.05보다 작은 경우 유의한 term으로 간주하였다. Lack of fit의 경우 Prob>F값이 0.05보다 크므로, 유의하지 않다는 것을 의미한다. 즉 model은 유의하고, lack of fit은 유의하지 않으므로 본 실험에서 구축된 model은 신뢰할만하다고 볼 수 있다. 또한 A, C, A^2, B^2 가 유의한 model term이라는 결과를 얻었다. AB, AC, BC는 모두 유의하지 않다는 결과가 나왔으므로, 본 실험에서 factor A, B, C 사이에 상호작용은 없었다는 결과를 얻었다.

Linear effects | Two-factor interaction effects | Quadratic effects

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4AB + b_5AC + b_6BC + b_7A^2 + b_8B^2 + b_9C^2$$

b_0 = 2.172E+007, b_1 = -1.552E+006, b_2 = 8.002E+005, b_3 = 9.528E+005,
b_4 = 3.378E+005, b_5 = -4.027E+005, b_6 = -2.946E+005, b_7 = 2.641E+006,
b_8 = -2.442E+006, b_9 = -1.130E+005

Y : response (total peak area)
b_0 : intercept
b_1 - b_9 : coefficients of the effects
$|b_X|$: implies the impact of the factors
+, - sign of the coefficients : shows the direction of relationship between the effects and the response

Figure 13. Response와 factor에 관한 이차다항식

Design-Expert software를 통해 response와 factor에 관한 이차다항식을 얻을 수 있다 (Figure 13). Figure 13에서 b_0는 y절편, b_1 - b_9은 각 effect의 계수를 의미한다. 이 계수들의 부호는 영향력의 방향성을, 절댓값은 영향력의 크기를 의미한다. b_1 - b_3는 factor A, B, C의 직선적인 영향력을, b_4 - b_6는 두 factor간의 상호작용의 영향력을, b_7 - b_9는 각 factor의 이차적인 영향력을 의미한다. 예를 들어 factor A의 영향력을 나타내는 b_1의 값은 -1.552E+006이므로, factor A가 클수록 response는 감소할 것으로 예상된다. 또한 factor C의 영향력을 나타내는 b_3는 9.528E+005이므로 b_1의 절댓값에 비해 작다. 그러므로 factor C가 factor A보다 response에 미치는 영향력이 더 작다는 것을 위의 식을 통해 알 수 있다. Figure 13의 b_1의 부호는 -이므로 factor A는 작을수록, b_3의 부호는 +이므로 factor C는 클수록 response 값이 크다는 것을 알 수 있다. Precondition 시 물의 양이 많아 SPE cartridge에 남아 있을 경우, 샘플 loading시에 cartridge에 남아 있는 물과 함께 phenolic acids가 소실되는 것으로 예상된다. Elution시 FA가 많을수록 proton ion의 exchange가 증가하여 phenolic acids의 용리가 증가하는 것으로 예상된다.

Figure 12의 위쪽에 있는 Model Graphs를 통해 figure 13의 식을 다양한 그래프로 시각화할 수 있는데 본 연구에서는 3D response surface로 나타냈다 (Figure 14, 15, 16). Figure 14, 15, 16은 세 가지 factor 중 두 가지 factor의 response (total peak area)에 대한 영향력을 나타내며, 이 때 나머지 factor는 고정되어 있다. 예를 들어 Figure 14의 경우 factor B가 20으로 고정되어 있을 때를 나타내는 그래프이다. Table 4에서 factor A는 직선적인 영향력, 이차적인 영향력이 유의한 의미를 지닌다고 하였다. Figure 13에서 b_1은 -1.552E+006, b_7은 2.641E+006이므로, figure 14에서 factor A가 증가할수록 response는 감소하고 아래가 볼록한 이차적인 그래프를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 즉 Figure 13의 식이 Figure 14, 15, 16에 시각적으로 잘 표현되어있다.

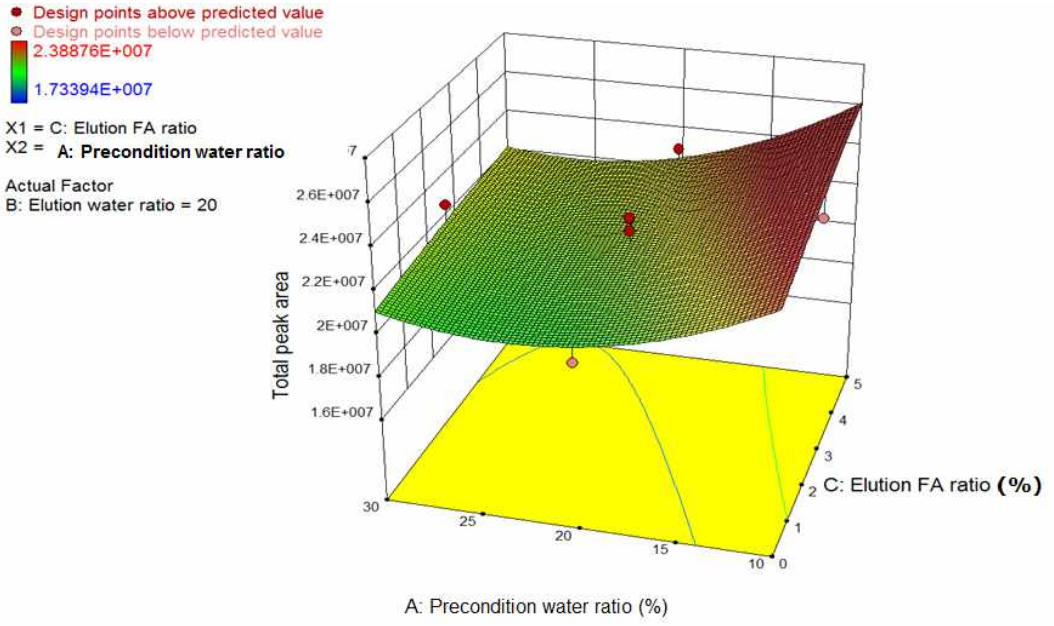

Figure 14. Factor A와 factor C에 대한 3D response surface

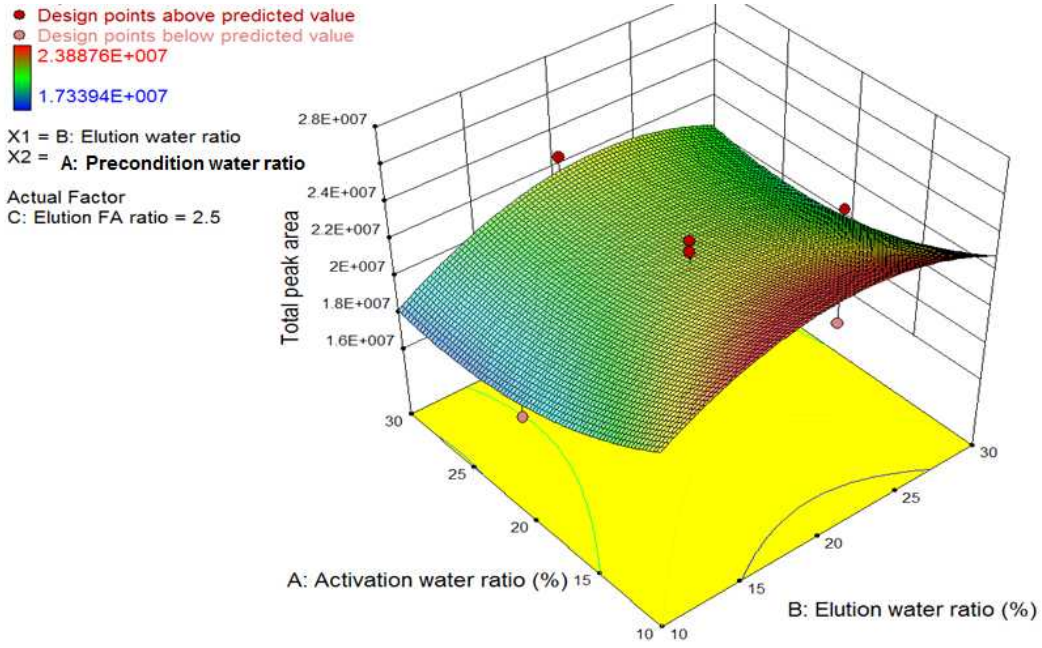

Figure 15. Factor A와 factor B에 대한 3D response surface

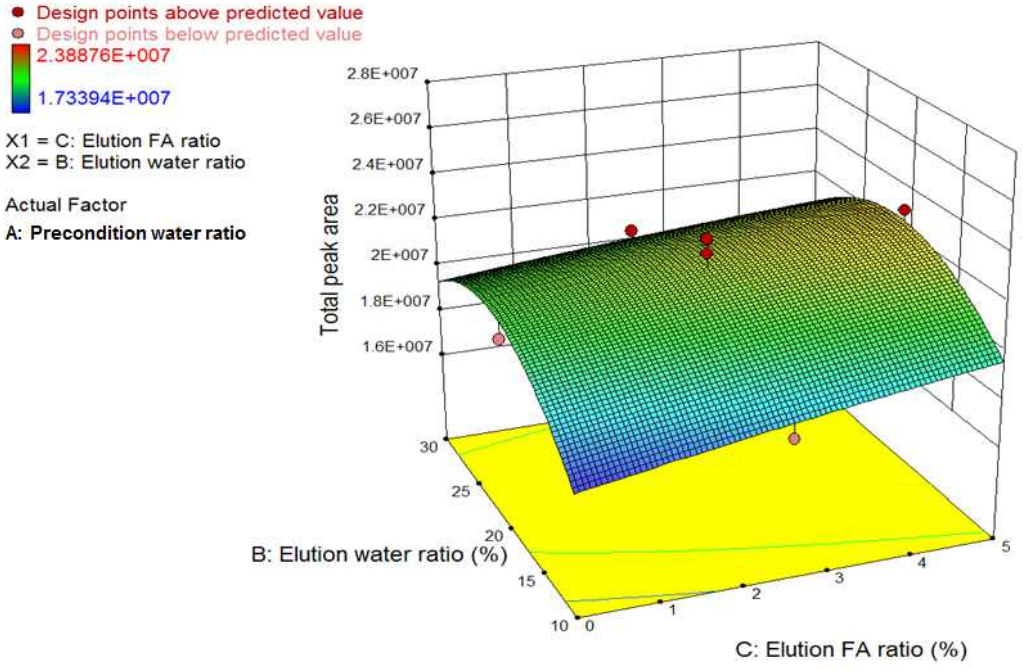

Figure 16. Factor B와 factor C에 대한 3D response surface

2. RSM model에 의한 예측값의 확인

RSM model을 통한 최적화를 위해서는 figure 17 왼쪽의 Optimization 아래 Numerical을 클릭한다. Figure 17 위쪽의 Criteria를 통해 최적화 조건을 설정할 수 있다. 본 실험의 목적은 SPE 실험 조건의 최적화였다. 즉 total peak area (response)를 최대로 하는 것이기 때문에 figure 17에서 Total peak area를 선택한 후, Goal을 maximize로 선택하였다. Figure 17에서 붉은색 네모로 표시한 값은 실제 실험한 20개 runs의 결과 중 최솟값 및 최댓값을 의미한다. RSM을 통해 최적화하면 실제 실험값보다 높은 값을 얻을 수 있기 때문에 figure 17의 Limits에 있는 Lower 및 Upper 값은 이 범위를 벗어나는 값을 입력할 수 있다.

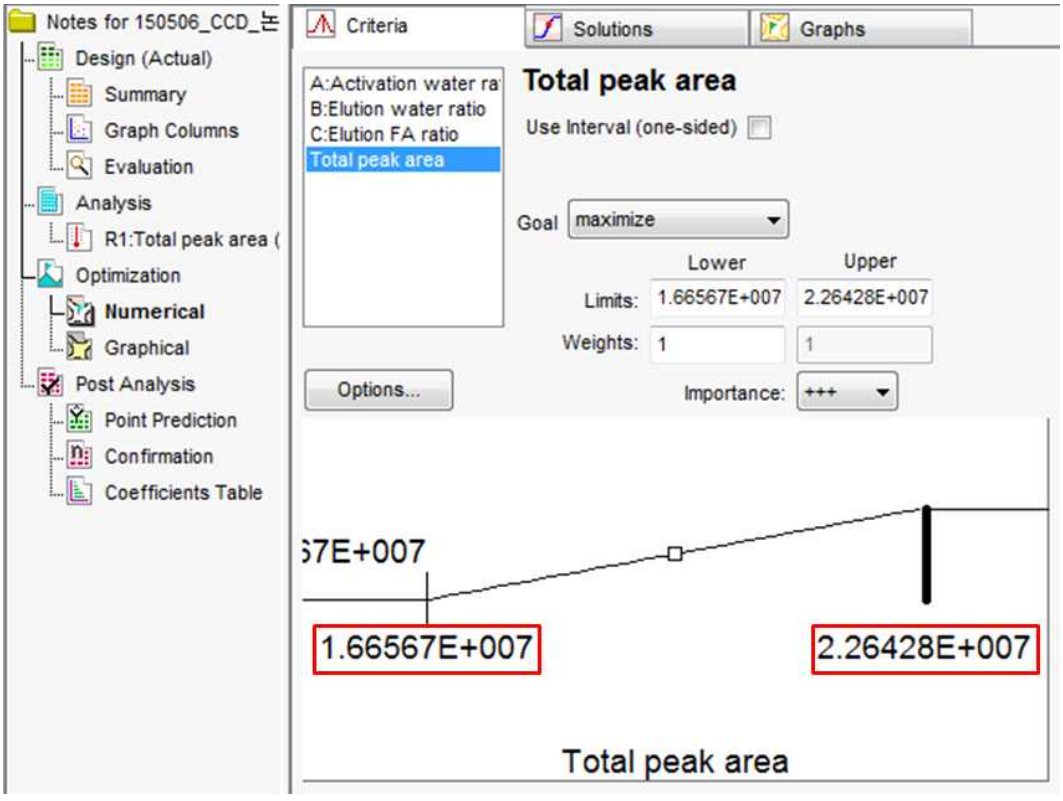

Figure 17. RSM model을 통한 최적화 과정

Figure 17 위쪽의 Solutions를 클릭하면 desirability가 높은 순으로 최적 조건을 확인할 수 있다. 결과는 다양한 형식으로 확인할 수 있는데 본 실험에서는 figure 18고 같이 Ramps 형식으로 나타냈다. 가장 desirability가 높은 조건은 figure 18과 같았다. Factor A는 11, factor B는 21, factor C는 4.5로 하여 3번의 실험을 진행하여 얻은 response의 평균값은 2.40892E+007이었다. 예측값과의 오차는 약 5%로, RSM model에 의한 최적 조건이 바람직하다고 할 수 있다.

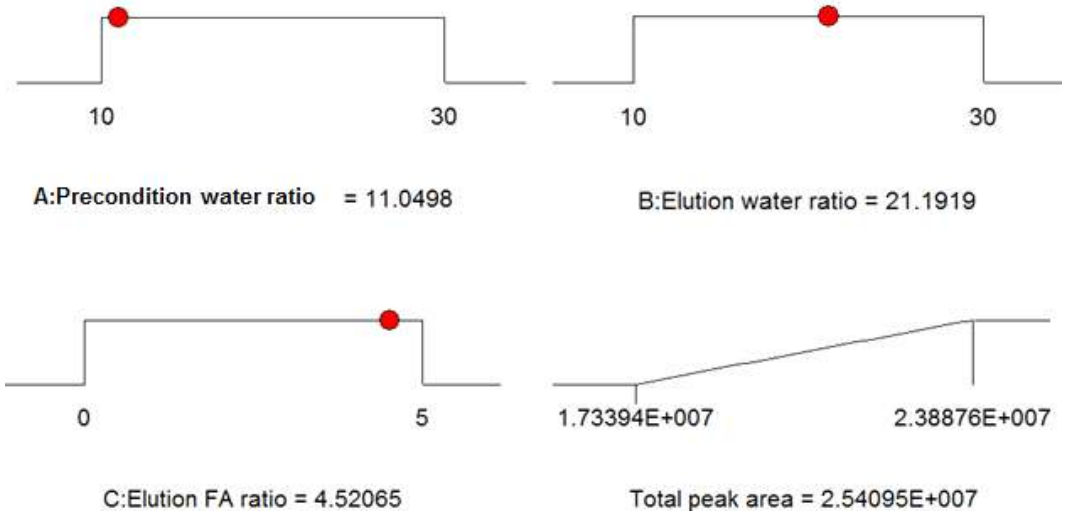

Figure 18. RSM model을 통해 예측된 각 factor의 최적값 및 예측된 response

Ⅳ. 결론

1. 자연으로부터 얻은 pollen grain을 SPE 흡착제로 이용하여 토양 속의 phenolic acids를 추출하고, LC/UV를 이용하여 시료를 분석하였다. 환경 친화적이고, 비용이 기존의 SPE에 비해 저렴한 분석법을 개발하였다.

2. SPE 실험 조건 중 실험 결과에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상되는 3개의 실험 조건에 대해 RSM을 이용해 최적화하였다. 최적화 결과 precondition시 물의 비율은 11%, elution시 물의 비율은 21%, elution시 FA의 비율은 4.5%일 때 최적 조건이라고 예상되었다. 실제 실험 결과 위의 실험 조건이 최적 조건임을 확인하였다.

3. 본 연구를 통해 실험 조건의 최적화에 있어 RSM이 효율적이고 정확한 과학적인 도구임을 확인할 수 있었다. 또한 SPE 흡착제로서 pollen grain의 가능성을 확인할 수 있었고, phenolic acids 뿐 아니라 다른 분석물질의 분석에도 pollen grain이 적용될 수 있을 것으로 기대한다.

Ⅴ. 참고문헌

1) Rufeng Wang, Ping Chen, Fang Jia, Jin Tang, Fang Ma, *Optimization of polysaccharides from Panax japonicus C.A. Meyer by RSM and its anti-oxidant activity.* International Journal of Biological Macromolecules 50 (2012) 331 - 336.

2) E. Rodriguez1, F. Navarro Villoslada, M.C. Moreno-Bondi, M.D. Marazuela, *Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 605 - 613.

3) Hassan Sereshtia, Soheila Samadia, Mehdi Jalali-Heravi, *Determination of volatile components of green, black, oolong and white tea by optimized ultrasound-assisted extraction-dispersive liquid - liquid microextraction coupled with gas chromatography.* Journal of Chromatography A, 1280 (2013) 1 - 8.

4) Hassan Sereshti*, Yahya Izadmanesh, Soheila Samadi, *Optimized ultrasonic assisted extraction - dispersive liquid - liquid microextraction coupled with gas chromatography for determination of essential oil of Oliveria decumbens Vent.* Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 4593 - 4598.

5) Behnaz Daneshvand, Katayoun Mahdavi Ara, Farhad Raofie, *Comparison of supercritical fluid extraction and*

ultrasound-assisted extraction of fatty acids from quince (Cydonia oblonga Miller) seed using response surface methodology and central composite design. Journal of Chromatography A, 1252 (2012) 1 - 7.

6) J. Cescut, E. Severac, C. Molina-Jouve, J.-L. Uribelarrea, *Optimizing pressurized liquid extraction of microbial lipids using the response surface method.* Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 373 - 379.

7) Qian Lua, Jian-Hong Wu, Qiong-Wei Yu, Yu-Qi Feng, *Using pollen grains as novel hydrophilic solid-phase extractionsorbents for the simultaneous determination of 16 plantgrowth regulators.* Journal of Chromatography A, 1367 (2014) 39 - 47.

8) NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/, 2015.5.17.

9) Hayriye Cetin-Karaca, Melissa C. Newman, *Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia Coli.* Food Bioscience, 11 (2015) 8 - 16.

10) F. Monlau, C. Sambusiti, A. Barakat, M. Quéméneur, E. Trably, J.-P. Steyer, H. Carrère, *Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review.* Biotechnology Advances 32 (2014) 934 - 951.

11) X.H. Qu, J.G. Wang, *Effect of amendments with different phenolic acids on soil microbial biomass, activity, and community diversity.* Applied soil ecology 39 (2008) 172 - 179.

Abstract

Pollen grain as a novel SPE sorbent for determination of nine phenolic acids and optimization using RSM

Hae Yoon Cho
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Analysis
The Graduate School
Seoul National University

Liquid-liquid extraction (LLE) or solid phase extraction (SPE) are usually used for removal of interfering substances and preconcentration of target compounds. SPE is a useful tool because it consumes less organic solvents. Generally, sorbent materials are an important factor in SPE. Conventional SPE materials are expensive and based on silica. Silica is a stable compound, therefore it is hard to be decomposed and can be harmful to the environment.

Recently, green analytical chemistry has gained a lot of interest because it uses less toxic, eco-friendly reagents. Pollen grains are powder like gametes produced in anther of stamen and are obtained from the nature. Exine, the outer wall of pollen grain, was used in drug delivery because it is chemically stable and composed of diverse biopolymer. In this study, pollen grains of pine were used as SPE sorbents.

Phenolic acids in effusion of plant roots affect the growth of microorganism in soil. Allelochemicals produced by microorganism stimulate or inhibit plant growth. In other words, the amount of phenolic acids in soil is a significant factor in plant growth. In this study, pollen grains were used as SPE sorbent and it extracted phenolic acids in soil. The samples were analyzed with HPLC/UV.

The condition for extraction of nine phenolic acids with SPE was optimization using response surface methodology (RSM). Central composite design (CCD) was used for experimental design. The optimum conditions determined by RSM were precondition water ratio of 11%, elution water ratio of 21% and elution formic acid ratio of 4.5%. The predicted value from RSM and mean value gained by experimenting three times under the optimum condition showed a high agreement.

In the result of this study, it is proven that it is effective to use RSM when calculating the optimum value and understanding the relationship between experimental factors and responses. The optimum value can be found effectively and scientifically with help of statistics tool such as ANOVA with minimum number of experiments using RSM.

Keyword: Phenolic acids, SPE (solid phase extracton) sorbent, Pollen grain, Green analytical chemistry, Response surface methodology (RSM), Central composite design (CCD), Analysis of variance (ANOVA)

Student Number : 2013-23470