

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018년 6월 28일 (28.06.2018) **WIPO | PCT**



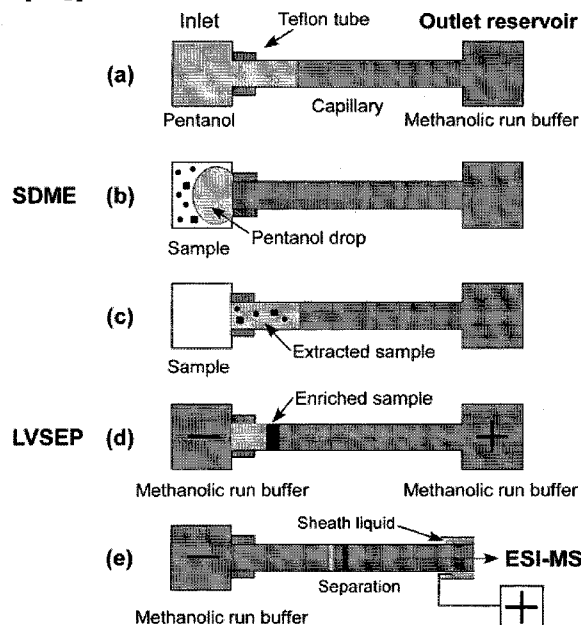
(10) 국제공개번호
WO 2018/117309 A1

- (51) 국제특허분류: **G01N 27/447** (2006.01) **G01N 27/62** (2006.01)
- (21) 국제출원번호: **PCT/KR2016/015187**
- (22) 국제출원일: **2016년 12월 23일 (23.12.2016)**
- (25) 출원언어: **한국어**
- (26) 공개언어: **한국어**
- (71) 출원인: 한국표준과학연구원 (**KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE**) [KR/KR]; 34113 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR). 서울대학교산학협력단 (**SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R & DB FOUNDATION**) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 최기환 (**CHOI, Ki Hwan**); 34127 대전광역시 유성구 죽동로 321, 104동 1402호, Daejeon (KR). 정두수
- (74) 대리인: 특허법인 플러스 (**PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM**); 35209 대전시 서구 한밭대로 809 10층, Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: CAPILLARY ELECTROPHORESIS-ELECTROSPRAY IONIZATION-MASS SPECTROMETRY USING SINGLE DROP MICROEXTRACTION AND LARGE-VOLUME STACKING

(54) 발명의 명칭: 단일 방울 미세추출법과 큰 부피 스택킹방법을 이용한 모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석

【도 2】



(57) Abstract: The present invention relates to a method for continuously stacking, separating, and analyzing a sample extracted as an organic droplet, through the linking of single drop microextraction (SDME) and large-volume stacking using an electroosmotic flow pump (LVSEP) with capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry (CE-ESI-MS). By applying the method of the present invention, the concentration coefficient of an extracted sample can be remarkably improved, the sample can be analyzed with a high sensitivity, and a soil pollutant sample having a low concentration can be conveniently and usefully analyzed without passing through a complex process.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/117309 A1

SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 단일 방울 미세추출법 (SDME) 과 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스테킹방법 (LVSEP) 을 CE-ESI-MS (모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석기)와 연동함으로써 유기 방울로 추출된 시료의 스테킹, 분리 및 분석을 연속적으로 하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법의 적용으로, 추출된 시료의 농축계수를 현저히 향상시키고 시료를 고감도로 분석할 수 있으며, 복잡한 과정을 거치지 않고도 저농도의 토양 오염물질 시료를 편리하고 유용하게 분석할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 단일 방울 미세추출법과 큰 부피 스택킹방법을 이용한 모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석

기술분야

- [1] 본 발명은 단일 방울 미세추출법(SDME)과 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스택킹방법(LVSEP)을 CE-ESI-MS(모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석기)와 연동함으로써 유기 방울로 추출된 시료의 스택킹, 분리 및 분석을 연속적으로 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 모세관 전기영동 방법은 전하를 띤 종류의 분리방법으로 매우 뛰어난 것이지만 매우 낮은 농도의 것은 그 감도를 높이기 위한 많은 노력들이 진행되고 있으며, 그 중 모세관내에서 시료를 스택킹하는 방법이 있다. 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스택킹(Large-volume stacking using the electroosmotic flow pump; LVSEP)은 낮은 전기 전도도를 갖는 용액에 녹아 있는 음이온 시료를 모세관에 다량 주입한 후 역전압을 걸면, 시료의 매트릭스가 전기삼투흐름(electroosmotic flow; EOF)에 의해 시료 주입부 쪽으로 제거되어 높은 분리도를 가지면서 시료가 농축되는 방법으로 높은 농축 효과를 기대할 수 있다. LVSEP는 비교적 쉬운 방법으로서 높은 농축 효과를 기대할 수 있는 방법으로, 최근에는 MS와 연결하여 사용하는 방법이 보고된 바 있다(한국등록특허 10-1144974). 상기 보고된 방법에서는 런버퍼를 담은 버퍼 바이얼(buffer vial)을 모세관 아웃렛에 두어 농축되는 동안 추가하는 과정을 이용하였으나, 스택킹의 효율성 정도는 시료의 매트릭스와 런버퍼 사이의 전도도 비율에 비례하는 이상, 시료의 전처리가 필요한 번거로움이 있었다.
- [3] 한편 단일 방울 미세추출법(single drop microextraction; SDME)은 마이크로시린지 바늘(microsyringe needle)끝에 마이크로 리터 부피의 단일방울(single drop)을 만들어서 그 방울(droplet)을 추출 용제(extractant)로 이용하여 추출하는 방식이다. SDME의 이러한 기본 방식을 기반으로, 액셉터(acceptor)의 부피를 크게 줄여 도우너(donor)와의 부피 차이를 좀 더 크게 함으로써 농축 효과를 증대시킬 수도 있다. 또한 최근에는 SDME 방법을 CE 및 MS 방법에 접목시켜 시료의 전처리와 분리분석을 한번에 수행하는 방법이 보고된 바 있다(한국등록특허 10-1160389).
- [4] 하지만 기존에 보고된 개별적인 LVSEP 및 SDME는 토양에 포함되어 있는 저농도의 오염물질 시료를 높은 농축 계수로 고감도로 분석하는 데는 기본적으로 만족스럽지 않은 것으로 관찰되었으며, 또한 상기의 분석을 위해서는 복잡한 과정의 전처리가 필요하고 아울러 저농도의 시료 물질을 별도로 농축해야 하는 복잡한 과정을 거칠 필요가 있었다. 따라서 토양에

포함되어 있는 저농도의 오염물질 시료를 복잡한 과정을 거치지 않고도 높은 농축 계수로 고감도로 분석할 수 있는 방법이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [5] 본 발명에서는 상기의 요구에 따라, 단일 방울 미세추출법(SDME)과 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스테킹방법(LVSEP)을 모두 CE-ESI-MS(모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석기)와 연동함으로써 유기 방울로 추출된 시료의 스테킹, 분리 및 분석을 연속적으로 하는 방법을 제공하고자 한다.
- [6] 또한 본 발명에서는 SDME와 LVSEP을 모두 CE-ESI-MS에 연동하는 것을 통하여, 추출된 시료의 농축계수를 현저히 향상시키고 시료를 고감도로 분석할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.
- [7] 또한 본 발명에서는 SDME와 LVSEP을 모두 CE-ESI-MS에 연동하는 것을 통하여, 복잡한 과정을 거치지 않고도 추출된 저농도의 토양 오염물질 시료의 농축계수를 현저히 향상시키고 시료를 고감도로 분석할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [8] 이하에서는 본 발명을 보다 상세히 설명하며, 발명의 요지를 모호하지 않게 하기 위하여 통상의 기술자에게 자명한 사실은 간략히 언급하거나 생략한다. 예를 들면, 일반적인 ESI-MS 질량분석기는 통상의 기술자에 있어 잘 알려진 것이며, 그 구조적인 상세한 설명 등은 생략하는 것이다.
- [9]
- [10] 상기한 과제를 위하여, 본 발명은
- [11] a) 모세관에 런버퍼를 주입하여 채우는 단계;
- [12] b) 질량분석기(MS)의 오리피스(orifice) 쪽의 모세관 아웃렛(outlet)에 런버퍼(run buffer)가 담겨진 아웃렛 저장용기를 두어 모세관 아웃렛이 잠기도록 하는 단계;
- [13] c) 유기 역셉터인 펜탄올을 모세관에 주입 후, 모세관의 인렛(inlet)부분을 도우너 용액(시료용액)에 담그는 단계;
- [14] d) 모세관에 주입된 펜탄올을 모세관의 인렛부분 쪽으로 끌어당겨 모세관의 인렛부분의 끝에 유기 방울을 형성하는 단계;
- [15] e) 상기 도우너 용액으로부터 상기 방울내로 시료를 추출하는 단계;
- [16] f) 시료가 농축된 방울내의 역셉터 용액을 모세관에 주입하고, 모세관의 인렛부분을 런버퍼에 담그는 단계;
- [17] g) 모세관의 인렛부분에 역전압을 걸어주어 추출된 시료를 스테킹하고, 모세관 전기영동의 전류변화를 관찰하여 전류의 변화가 급격히 일어날 때 상기 아웃렛 저장용기를 제거하는 단계; 및

- [18] h) 질량분석기에서 시이쓰 용액(sheath liquid)을 흘려주고 전기분무 이온화 전압(electrospray ionization voltage: ESI voltage)을 가하여 스테킹된 농축시료가 질량분석기로 이동하도록 하는 단계;
- [19] 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일 방울 미세추출법(SDME)과 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스테킹방법(LVSEP)을 CE-ESI-MS(모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석기)와 효과적으로 연동함으로써 유기 방울로 추출된 시료의 스테킹, 분리 및 분석을 연속적으로 하는 방법을 제공한다.
- [20]
- [21] 본 발명의 방법에서는, d) 단계에서 형성되는 유기 방울이 모세관의 인렛부분의 끝에 안정적으로 유지되게 하기 위하여, 모세관의 인렛부분은 소수성 지지체인 테프론 슬리브(Teflon sleeve)로 코팅되어 있을 수 있다(도 1). 이 때 상기 유기 방울은 이후의 LVSEP 적용이 원활할 정도의 크기를 가져야 하며, 상기 유기 방울이 LVSEP 적용이 원활할 정도의 크기를 안정적으로 유지하기 위해서는, 모세관의 인렛부분은 소수성 지지체인 테프론 슬리브(Teflon sleeve)로 코팅되어 있는 것이 바람직하다.
- [22] 본 발명의 방법의 b) 단계에 있어서는, 모세관 전기영동장치의 모세관 아웃렛과 질량분석기의 샘플러 오리피스 콘(sampler orifice cone) 사이에 버퍼 용액이 담겨 있는 아웃렛 저장용기를 착탈가능하도록 구비할 수 있다. 이 때 모세관 아웃렛이 아웃렛 저장용기의 버퍼 용액에 잠기게 하여 접촉하도록 구성하는 것이 매우 중요하다.
- [23] 본 발명의 방법의 c) 단계에 있어서는, SDME와 LVSEP의 연동이라는 방법적 특징의 원활한 구현을 위한 차원에서, 유기 억셉터이자 추출 용매로 펜탄올을 채택한다. 한편 유기 억셉터이자 추출 용매로 고급 알코콜인 옥탄올을 모세관에 주입하여 SDME와 LVSEP를 연동하는 경우, 옥탄올의 고점성(9.85 cP, 20°C)으로 인하여, LVSEP 적용 시 시료 매트릭스로 옥탄올이 모세관으로부터 원활히 제거되지 않으며 아울러 모세관 내부의 막힘 현상까지 발생하는 문제가 있다. 본 발명의 방법의 c) 단계에 있어서, 펜탄올을 모세관에 소량으로 주입함이 바람직하며, 보다 구체적으로 모세관 전체 부피 대비 5 내지 20%로 주입함이 바람직하다(도 2(a)).
- [24] 본 발명의 방법의 c) 단계에 있어서, 상기 도우너 용액에 적용되는 시료는 바람직하게 토양 오염물질일 수 있다. 상기 오염물질은 예시적으로 (4-클로로-2-메틸페녹시)아세트산((4-Chloro-2-methylphenoxy)acetic acid; MCPA: pK_a 3.14), 2,4,5-트리플루오로벤조산(2,4,5-trifluorobenzoic acid: pK_a 2.53), 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산(2,3,4,5-tetrafluorobenzoic acid: pK_a 2.87), 2-메틸-4,6-디니트로페놀(2-Methyl-4,6-dinitrophenol; 4,6-DNOC: pK_a 4.70), 2,4-디니트로페놀(2,4-dinitrophenol; 2,4-DNP: pK_a 4.07) 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 상기 예시적 오염물질은 토양에 포함될 수 있는 유해 물질이며, 본 발명의

방법에 적용될 수 있는 유용한 분석 물질에도 해당한다. 상기 예시적 오염물질을 상기 도우너 용액에 적용할 때, 상기 도우너 용액의 pH는 0.5 내지 2인 것이 바람직하다. 상기 예시적 오염물질은 2.53 내지 4.70의 pK_a 범위를 나타내는 이상, 도우너 용액의 pH 범위로 0.5 내지 2가 채택되어야 상기 예시적 오염물질이 주로 중성 상태로 존재하게 되며, 이에 이후 e) 단계에서 상기 중성 상태의 예시적 오염물질이 유기 역셉터인 펜탄올에 의하여 원활히 추출될 수 있으며 나아가 역셉터 용액의 낮은 전기 전도도도 확보되어 이후 LVSEP의 적용도 원활해진다. 다른 한편 도우너 용액에서 상기 예시적 오염물질의 일부 존재 형태로 염이나 염기성 화합물과 같은 이온 형태는 유기 역셉터인 펜탄올에 의하여 원활히 추출되기 어렵다. 또한 상기 도우너 용액에 적용되는 시료로 토양 오염물질은 도우너 용액에 바람직하게 70 nM 이하의 저농도로 포함되어 있을 수 있으며, 보다 바람직하게 1 내지 70 nM의 저농도로 포함되어 있을 수 있다.

- [25] 본 발명의 방법의 d) 단계에 있어서, 모세관의 인렛부분의 끝에 유기 방울을 형성하기 위하여(도 2(b)), 방울을 만드는 데 필요한 역방향의 압력을 가할 수도 있으며 또는 모세관의 인렛부분 쪽에서 진공을 이용하여 방울을 만들 수도 있다. 이 때 방울을 만들기 위해서 컬럼(모세관 인렛부분의 반대편 쪽의 모세관 컬럼)밖으로 빠져나가는 방울의 부피만큼 아웃렛 쪽의 컬럼에 비어가는 공간이 생기게 된다. 따라서 모세관의 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 런버퍼로 보충하여 채워 전기적 접촉을 유지할 필요가 있다. 또한 이후의 LVSEP를 원활하게 적용할 수 있는 수준으로, 형성된 유기 방울 내의 염의 농도를 낮출 필요가 있다.
- [26] 본 발명의 방법의 e) 단계에 있어서, 도우너 용액(시료용액)으로부터 펜탄올 방울내로 시료를 적어도 5분 이상 동안 추출한다(도 2(b)). 이 때 추출 과정에서 방울의 안정성을 유지하기 위하여, 방울 표면의 표면력(surface force)을 상쇄(counteract)하기 위한 소정의 압력을 적용함이 바람직하며, 보다 구체적으로 상기 압력 조건은 5 내지 20분 동안 0.5 내지 1.0 psi 일 수 있다. 또한 도우너 용액(시료용액)의 pH를 적절히 조절함으로써, 시료가 중성화된 상태로 펜탄올 방울내로 잘 추출되도록 할 필요가 있다.
- [27] 본 발명의 방법의 f) 단계에서는, 시료가 농축된 방울내의 역셉터 용액을 모세관에 주입하고, 모세관의 인렛부분을 런버퍼에 담근다. 보다 구체적으로 시료가 농축된 방울내의 역셉터 용액에 유압(hydrodynamically)을 가하여 추출된 시료를 모세관에 주입하고(도 2(c)), 상기 유압 조건은 바람직하게 0.5 내지 1분 동안 2 내지 6 psi 일 수 있다. 이 때 추출된 시료를 포함하는 상기 역셉터 용액은 모세관 전체 부피 대비 5 내지 15%로 주입됨이 바람직하다. 특히 상기 역셉터 용액이 모세관 전체 부피 대비 15% 초과로 주입되는 경우, 시료의 최종 농축계수가 저하될 수 있을 뿐만 아니라 이후의 LVSEP 적용에 따른 시료 스택킹에 많은 시간이 소요될 수 있으므로, 전반적으로 방법의 효율성이 저해될 수 있다.

- [28] 본 발명의 방법의 f) 단계까지(SDME 적용)를 거쳐 모세관에 주입된 추출 시료에 대하여, g) 단계에서부터 LVSEP를 적용한다(도 2(d)). 본 발명의 방법에 있어 펜탄올은 SDME 적용을 위한 유기 엑셉터로 작용하며, 특징적으로 나아가 LVSEP 적용을 위한 시료 매트릭스로도 작용하게 된다. LVSEP 적용 시 모세관의 인렛부분에 역전압을 걸어주게 되면 추출 시료에 전기장이 많이 가해지게 되고, 동시에 EOF는 모세관의 인렛부분 쪽으로 향하는 방향이기 때문에 시료 매트릭스는 모세관 밖으로 빠져나가게 된다. 이에 따라 추출 시료는 모세관 밖으로 빠져나가는 시료 매트릭스 영역과 런버퍼 사이의 농축 영역에서 스테킹된다(도 2(d)).
- [29] 본 발명의 방법의 g) 단계에서 역전압을 걸어줄 때, 전기삼투흐름(EOF)이 시료의 전기영동속도보다 작도록 한다. 추출 시료가 다량 주입되어 있는 LVSEP 적용 초기에는 EOF가 시료의 전기영동 속도(electrophoretic velocity; EPV)보다 크지만, 시료 매트릭스가 빠져나가서 분리가 일어날 때는 EOF가 더 작아야만 한다. 이를 위하여, 본 발명의 런버퍼는 바람직하게 EOF를 크게 낮출 수 있는 비수용액성 용매를 버퍼로 사용하는 형태일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 비수용액성 용매는 메탄올일 수 있다. 또는 EOF를 낮출 목적으로, 본 발명의 런버퍼는 중성 또는 낮은 pH의 버퍼에 전기삼투흐름 변형제(EOF modifier)를 첨가하여 사용하는 형태일 수도 있다. 따라서 크게 감소된 EOF로 인해서 농축된 추출 시료의 전기영동 속도는 상기 EOF를 극복하고 검출기 쪽으로 진행하면서 서로 분리되게 된다. 즉 LVSEP는 낮은 전기 전도도를 갖는 용액에 녹아 있는 추출 시료를 모세관에 다량 주입한 후 역전압을 걸면, 시료의 매트릭스가 EOF에 의해 시료 주입부 쪽으로 제거되어 높은 분리도를 가지면서 시료가 농축되는 방법으로 높은 농축 효과를 기대할 수 있다.
- [30] 본 발명의 방법의 g) 단계에서, 역전압을 걸어주어 추출된 시료를 스테킹하는 동안, 시료의 매트릭스인 펜탄올이 전기삼투흐름에 의해 모세관의 인렛부분 쪽으로 제거되게 된다. 이 때 펜탄올이 전기삼투흐름에 의해 모세관의 인렛부분 쪽으로 제거되는 동안에도, 모세관 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 런버퍼가 보충하여 채우게 된다.
- [31] 본 발명의 방법의 g) 단계에서는, 시료를 스테킹하고 모세관 전기영동의 전류변화를 관찰하여 전류의 변화가 급격히 일어날 때 상기 아웃렛 저장용기를 제거하게 된다. LVSEP 과정 중에 모세관 전기영동의 전류를 관찰하면 시료 매트릭스가 빠지고 런버퍼가 채워질 때 전류가 급격히 변화하며, 이 때 모세관 아웃렛(capillary outlet)에 놓았던 런버퍼 저장용기를 제거한다. 전류가 급격히 변화함에 있어서, 전류값의 급격한 증가 정도는 바람직하게 3.0 μ A 이상이며, 보다 바람직하게 3.0 내지 8.0 μ A이다.
- [32] 본 발명의 방법의 h) 단계에서는(도 2(e)), 모세관 아웃렛(capillary outlet)에 놓았던 런버퍼 저장용기가 이미 제거된 상태이며, 전기분무 이온화 전압(electrospray ionization voltage)을 주게 되면 CE와 MS를 통해 걸리는 전체

전압의 크기가 줄어들기 때문에 몇 분 후 전류값이 약간 변한다. 결과적으로 이전 단계에서 스테킹된 농축시료는 모세관 아웃렛(capillary outlet) 쪽으로 이동하면서 전기영동에 의하여 분리되어 질량분석기로 검출이 가능해진다.

발명의 효과

- [33] 본 발명은 SDME와 LVSEP을 모두 CE-ESI-MS에 연동하는 방법을 적용하여, 추출된 시료의 농축계수를 개별적인 SDME 또는 LVSEP 연동의 경우에 비하여 현저히 향상시키고, 시료를 고감도로 분석할 수 있다.
- [34] 본 발명은 SDME와 LVSEP을 모두 CE-ESI-MS에 연동하는 방법을 적용하여, 복잡한 과정을 거치지 않고도 추출된 저농도의 토양 오염물질 시료의 농축계수를 현저히 향상시키고 시료를 고감도로 분석할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [35] 도 1은 본 발명의 방법에 적용되는 장치적 특징의 개념도식도이다.
- [36] 도 2는 본 발명의 방법에 대한 개략적인 설명을 하기 위한 개념도식도이다.
- [37] 도 3에서, (a)는 5 μ M의 시료에 대하여 종래의 CE-ESI-MS를 적용한데 따른 Mass electropherogram을 보여주며, (b)는 10 nM의 시료에 대하여 본 발명의 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용한데 따른 Mass electropherogram을 보여준다. 시료 피크: (1) MCPA; (2) 2,4,5-트리플루오로벤조산; (3) 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산; (4) 4,6-DNOC; (5) 2,4-DNP
- [38] 도 4는 오염물질 시료를 포함하는 실제 토양 샘플에 대하여 본 발명의 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용한데 따른 Mass electropherogram을 보여준다. SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용하기 직전에, 시료에 포함된 각각의 분석물질의 스파이킹된 농도(spiked concentration)는 20 μ g/L이다. 시료 피크: (1) MCPA; (2) 2,4,5-트리플루오로벤조산; (3) 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산; (4) 4,6-DNOC; (5) 2,4-DNP

발명의 실시를 위한 형태

- [39] 이하, 하기 실시예에서 본 발명을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 치환 및 균등한 타 실시예로 변경할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백할 것이다.

[40]

[41] <시료 준비>

- [42] 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 및 2,4-디니트로페놀은 Aldrich(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였다. (4-클로로-2-메틸페녹시)아세트산(MCPA)은 TCI(Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. 2-메틸-4,6-디니트로페놀(4,6-DNOC), 포름산암모늄(ammonium formate), 수산화나트륨(sodium hydroxide), 수산화암모늄 용액(ammonium

hydroxide solution), 초산암모늄(ammonium acetate), 염산(hydrochloric acid), HPLC용 등급의 메탄올(HPLC-grade methanol), HPLC용 등급의 펜탄올(1-펜탄올)(HPLC-grade 1-pentanol), 및 HPLC용 등급의 이소프로필알코올(HPLC-grade isopropyl alcohol)은 Sigma(St. Louis, Mo, USA)로부터 구입하였다. 디이온화된 물(Deionized water)은 Milli-Q system(Millipore, Bedford, MA, USA)을 사용하여 준비하였다.

[43]

[44] <CE-ESI-MS>

[45] 모세관의 기본 형태는 총 길이 100 cm, 50 μ m ID, 및 280 μ m OD를 가지는 코팅되지 않은 fused silica capillary(Postnova, Landsberg am Lech, Germany)이며, 모세관을 80 psi에서 0.1 M NaOH, 물 및 런버퍼로 각각 10분간 씻었다. 런버퍼는 메탄올을 가지고 pH 8.0으로 맞춘 25 mM 포름산암모늄(ammonium formate)이다. 모세관 카트리지는 25°C 에서 세팅하였다.

[46] CE는 32 Karat 소프트웨어를 갖는 Beckman(Fullerton, CA, USA)의 MDQ CE 시스템을 사용하여 수행하였으며, 전기영동은 -22 kV의 역전압으로 행해졌다. MS는 triple quadrupole mass spectrometer(Quattro LC, Waters-Micromass, Manchester, UK)를 가지고 수행하였으며, Masslynx 3.3 소프트웨어로 조절하였다. MS에서 이소프로필알코올/물(80:20 v/v) 혼합용매 내 2mM 초산암모늄(ammonium acetate)의 시이스액(sheath liquid)은 시린지 펌프에 의해 1.0 μ L/min의 속도로 흘러 주었다. MS에서 음이온화 모드(negative ionization mode)에서 20 V(cone voltage of 20 V)가 사용되었다. MS에서 이온화소스 블록 온도(ionization source block temperature)는 80°C로 세팅되었으며, 20 L/h의 흐름속도의 질소가스가 흡입가스(nebulizer gas)로 사용되었다. ESI 전압은 -2.5 kV로 세팅되었다.

[47] 분석 시료는 MCPA, 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 4,6-DNOC 및 2,4-DNP으로 이루어진 혼합물로서, 런버퍼에 5 μ M의 농도로 용해된 상태로 10초 동안 1 psi 압력 하에 모세관에 주입되었다.

[48] 분석 시료의 CE-ESI-MS에 대한 MS 스펙트럼 데이터는 m/z 20~500 범위에서 MRM(multiple reaction monitoring) 모드 하에서 기록되었으며([표 1]), 아울러 Mass electropherogram을 관찰하였다(도 3(a)).

[49]

[50] [표 1]

분석 시료의 구성 물질	MRM trace (m/z)	충돌 에너지 (eV)
MCPA	199 > 141	15
2,4,5-트리플루오로벤조산	175 > 131	10
2,3,4,5-테트라플루오로벤조산	193 > 149	10
4,6-DNOC	197 > 123	25
2,4-DNP	183 > 109	25

[51]

[52] <SDME-LVSEP-CE-ESI-MS: 실시예 1>

[53] 사용되는 모세관은 총 길이 100 cm, 50 μ m ID, 및 280 μ m OD를 가지는 fused silica capillary(Postnova, Landsberg am Lech, Germany)이며, 사용되는 런버퍼는 메탄올을 가지고 pH 8.0으로 맞춘 25 mM 포름산암모늄(ammonium formate)이었다.

[54] SDME 본격 적용에 앞서, 모세관을 1 M NaOH 및 물로 각각 10분간 씻었으며, 모세관의 인렛부분을 소수성 지지체인 테프론 슬리브(Teflon sleeve)(500 μ m OD, Zeus, SC, USA)로 코팅하였다(도 1).

[55] SDME 본격 적용에 있어, 인렛부분이 테프론 슬리브로 코팅된 모세관에 런버퍼를 주입하여 채웠다. 또한 질량분석기(MS)의 오리피스(orifice) 쪽의 모세관 아웃렛(outlet)에 런버퍼가 담겨진 아웃렛 저장용기를 두어 모세관 아웃렛이 잠기도록 하였다.

[56] 다음으로 유기 역셉터인 펜탄올을 모세관에 모세관 전체 부피 대비 10%(180 nL)로 주입 후(도 2(a)), 모세관의 인렛(inlet)부분을 도우너 용액(0.1 M HCl 산성수용액: pH 1.0)에 담겼다. 이 때 도우너 용액(시료용액)은 분석 시료를 포함하며, 분석 시료는 토양 오염물질로 MCPA, 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 4,6-DNOC 및 2,4-DNP으로 이루어진 혼합물(도우너 용액 내 농도: 10 nM)이었다. 도우너 용액의 pH 조건인 pH 1.0에서, 상기 오염물질은 주로 중성 상태로 존재하게 됨을 확인하였다.

[57] 다음으로 20분 동안 2 psi로 역방향의 압력을 가하여 모세관에 주입된 펜탄올을 모세관의 인렛부분 쪽으로 끌어당겨 모세관의 인렛부분의 끝에 유기 방울을 형성하였으며, 이에 따라 모세관의 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 아웃렛 저장용기의 런버퍼로 보충하여 채웠다. 모세관의 인렛부분의 끝에 형성된 펜탄올 유기 방울로 도우너 용액(시료용액)으로부터 분석 시료를 10분간 추출하였으며(도 2(b)), 이 때 10분 동안 0.8 psi의 압력으로 방울 표면의 표면력(surface force)을 상쇄(counteract)함으로써 추출 과정에서의 방울의 안정성을 유지하였다.

[58] 다음으로 분석 시료가 농축된 펜탄올 방울내의 역셉터 용액에 0.9분 동안 5

psi로 유압(hydrodynamically)을 가하여 추출된 분석 시료를 모세관에 주입하였으며(도 2(c)), 이 때 상기 역셉터 용액을 모세관에 모세관 전체 부피 대비 10%로 주입하였다. 이어서 모세관의 인렛부분을 런버퍼에 담겼으며, 구체적으로 모세관의 인렛부분이 담기는 저장용기가 도우너 용액 저장용기에서 런버퍼 저장용기로 바뀌는 것에 해당한다. 이 때까지의 SDME 적용은 10분 동안 진행되었다.

- [59] 다음으로 모세관의 인렛부분에 -22 kV의 역전압을 걸어주어 추출된 분석 시료를 스테킹하는 것으로 LVSEP의 적용이 시작되었으며(도 2(d)), 모세관에 주입된 역셉터 용액의 펜탄올은 LVSEP 적용을 위한 시료 매트릭스로도 작용하였다. LVSEP의 적용에 의하여 EOF는 모세관의 인렛부분 쪽으로 향하는 방향이기 때문에 시료 매트릭스인 펜탄올은 모세관 밖으로 빠져나가게 되며, 이 때도 모세관 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 아웃렛 저장용기의 런버퍼로 보충하여 채웠다. 추출된 분석 시료는 모세관 밖으로 빠져나가는 시료 매트릭스 영역과 런버퍼 사이의 농축 영역에서 스테킹되며(도 2(d)), 모세관 전기영동의 전류가 13 ± 2 분 안에 약 $0 \mu\text{A}$ 에서 $5.5 \pm 0.3 \mu\text{A}$ 로 급격하게 증가했을 때 아웃렛 저장용기를 수동으로 제거하였으며, 이와 같이 모세관 전기영동의 전류가 급격하게 변하는 것을 확인함으로써 시료 스테킹을 완료하였다. 역셉터 용액을 모세관에 주입한 시점을 기준으로 시료 스테킹은 15분 후에 완료되었다.
- [60] 다음으로 CE-ESI-MS와의 연동이 이루어졌다. CE는 32 Karat 소프트웨어를 갖는 Beckman(Fullerton, CA, USA)의 MDQ CE 시스템을 사용하여 수행하였으며, 전기영동에 의한 시료의 분리는 0.7 psi 압력 하에 -22 kV의 전압을 적용하여 행해졌다. MS는 triple quadrupole mass spectrometer(Quattro LC, Waters-Micromass, Manchester, UK)를 가지고 수행하였으며, Masslynx 3.3 소프트웨어로 조절하였다. MS에서 이소프로필알코올/물(80:20 v/v) 혼합용매 내 2mM 초산암모늄(ammonium acetate)의 시이스액(sheath liquid)은 시린지 펌프에 의해 $1.0 \mu\text{L}/\text{min}$ 의 속도로 흘러 주었다. MS에서 음이온화 모드(negative ionization mode)에서 20 V(cone voltage of 20 V)가 사용되었다. MS에서 이온화소스 블록 온도(ionization source block temperature)는 80°C 로 세팅되었으며, 20 L/h의 흐름속도의 질소가스가 흡입가스(nebulizer gas)로 사용되었다. ESI 전압은 -2.5 kV로 세팅되었다. ESI 전압의 적용으로, 스테킹된 농축시료로 MCPA, 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 4,6-DNOC 및 2,4-DNP으로 이루어진 혼합물에 있어 각각의 개별 물질들은 수소이온이 떨어져나간 음이온으로 해리되게 된다. 따라서 음이온으로 해리된 상기 각각의 개별 물질들로 이루어진 혼합물 시료는 모세관 아웃렛(capillary outlet) 쪽으로 이동하면서 전기영동에 의하여 분리되어 질량분석기로 검출이 가능해지며(도 2(e)), 이에 따라 Mass electropherogram을 관찰하였다(도 3(b)).
- [61] 한편 도 3(b)에 따른 본 발명의 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS에 대한 Mass electropherogram(도 3(b))에서는, 각각의 분석 물질에 대한 피크의 이동

시간(migration time)이 CE-ESI-MS의 경우(도 3(a))에 비하여 15분 정도 더 길은 것으로 관찰된다. 본 발명의 경우 LVSEP의 적용에 따른 시료 스테킹에 15분의 시간이 소요되는 것이 상기 시간적 차이를 유발시키는 것으로 사료된다.

[62]

[63] <SDME-LVSEP-CE-ESI-MS, LVSEP-CE-ESI-MS 및 SDME-CE-ESI-MS에 따른 시료의 농축계수(EF: enrichment factor) 비교>

[64] 실시예 1(SDME-LVSEP-CE-ESI-MS): 앞서 상세 기재한 바와 같이 본 발명의 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용한 데 따르며, 분석 시료는 MCPA, 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 4,6-DNOC 및 2,4-DNP으로 이루어진 혼합물이다. 분석 시료는 10 nM의 농도로 도우너 용액에 용해되었다.

[65] 비교예 1(LVSEP-CE-ESI-MS): SDME를 적용하지 않는 것과 분석 시료의 농도가 상이한 것을 제외하고는, 기본적으로 실시예 1에서와 동일한 방법이 적용되었다. 분석 시료는 실시예 1의 경우와 동일한 물질이다. 런버퍼 역시 실시예 1의 경우와 동일하게 메탄올을 가지고 pH 8.0으로 맞춘 25 mM 포름산암모늄(ammonium formate)이다. 분석 시료는 200 nM의 농도로 펜탄올에 용해되었으며, 이에 따라 분석 시료를 포함한 펜탄올 용액은 모세관에 모세관 전체 부피 대비 10%로 주입되었다. 다음으로 실시예 1과 동일하게 -22 kV의 역전압을 걸어주어 시료를 스테킹하였으며, 스테킹 완료 후에는 실시예 1의 경우와 동일한 CE-ESI-MS 작동 조건이 적용되었다.

[66] 비교예 2(SDME-CE-ESI-MS): LVSEP를 적용하지 않는 것과 분석 시료의 농도가 상이한 것을 제외하고는, 기본적으로 실시예 1에서와 동일한 방법이 적용되었다. 분석 시료는 실시예 1의 경우와 동일한 물질이다. 런버퍼 역시 실시예 1의 경우와 동일하게 메탄올을 가지고 pH 8.0으로 맞춘 25 mM 포름산암모늄(ammonium formate)이다. 분석 시료는 100 nM의 농도로 도우너 용액(0.1 M HCl 산성수용액)에 용해되었으며, 분석 시료를 추출할 유기 역셉터로는 실시예 1의 경우와 동일하게 펜탄올이 사용되었다. 다음으로 실시예 1의 경우와 동일하게 모세관의 인렛부분의 끝에 형성된 펜탄올 유기 방울로 도우너 용액으로부터 분석 시료를 10분간 추출하였으며, 추출된 시료를 모세관에 주입한 후의 CE-ESI-MS 작동 조건은 실시예 1의 경우와 동일하였다.

[67] 종래의 CE-ESI-MS의 적용 경우와 대비하여 상기 실시예 1 및 비교예들의 각각의 방법의 적용에 따른 시료의 농축계수를 하기 [표 2](농축계수들의 비교 ($n=4$))에 기재하였다.

[68]

[69] [표2]

분석 시료의 구성 물질	실시에 1:SDME-LVSEP- CE-ESI-MS	비교예 1:LVSEP-CE- ESI-MS	비교예 2:SDME-CE- ESI-MS
MCPA	1100 ± 90	19 ± 2	90 ± 3
2,4,5-트리플루오로벤조산	640 ± 100	16 ± 2	50 ± 6
2,3,4,5-테트라플루오로벤조산	600 ± 70	17 ± 2	87 ± 4
4,6-DNOC	1300 ± 130	34 ± 3	70 ± 4
2,4-DNP	670 ± 50	25 ± 3	42 ± 5

[70]

[71] 일단 상기 [표 2]의 기재에 의하면, 본 발명의 실시예 1의 방법의 적용 시 수백 내지 천 배(several hundred to- thousand-fold)의 농축계수가 확인된다. 하지만 비교예들의 방법의 적용시에는, 수십 배(scores-fold)의 농축계수가 확인될 뿐이다. 따라서 상기 [표 2]의 대비에서와 같이, 본 발명의 실시예 1에서의 분석 시료를 구성하는 각각의 개별물질들에 대한 농축계수 값은 비교예들의 경우에 비하여 10배 이상으로 향상된 것으로 확인된다. 이 때 본 발명의 실시예 1에서의 분석 시료의 농도는 저농도인 10 nM임을 감안하면, 상기와 같이 향상된 농축계수는 본 발명의 현저성을 더욱 뒷받침한다. 즉 SDME와 LVSEP를 모두 연동하는 본 발명의 방법의 적용 시, 이중 농축(double concentration)에 따른 시너지 효과가 확인되는 것이다. 특히 분석 시료는 토양에 포함될 수 있는 오염물질인 이상, 본 발명의 방법에 의하여 저농도의 토양 오염물질 시료를 고농축계수에 따라 고감도로 분석할 수 있다.

[72]

[73] <오염물질 시료를 포함하는 실제 토양 샘플에 대하여 본 발명의 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용: 실시예 2>

[74] 0.5 g의 토양 샘플에 포함되는 분석 시료는 MCPA, 2,4,5-트리플루오로벤조산, 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산, 4,6-DNOC 및 2,4-DNP으로 이루어진 혼합물이다. 분석 시료를 포함하는 상기 토양 샘플을 표준 용액(standard solution)으로 스파이킹(spiked)한 후, 상온에서 밤새 완전히 건조시켰다. 다음으로 물 10 mL를 토양 샘플에 첨가하고, 이에 따른 혼합물을 30분 동안 초음파처리(ultrasonicated)하였다. 초음파처리에 따른 상부 용액(upper solution) 1 mL를 0.2 M HCl로 희석하여 2 mL로 조정하였으며, 이에 따른 스파이킹(spiked)된 토양 샘플(농도 수준: 50 nM)에 바로 SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용하였다(SDME-LVSEP-CE-ESI-MS를 적용하기 직전에, 시료에 포함된 각각의 분석물질의 스파이킹된 농도(spiked concentration)는 20 µg/L). SDME-LVSEP-CE-ESI-MS의 적용에 있어, LVSEP에

따른 시료 스테킹 시간은 20분이었으며, 이에 따라 Mass electropherogram(도 4)에서의 각각의 분석 물질에 대한 피크의 이동 시간(migration time)이 CE-ESI-MS의 경우(도 3(a))에 비하여 20분 정도 더 길은 것으로 관찰되었다. 실시예 2에 있어서는 도우너 용액과 시료 스테킹 시간을 제외하고는 기본적으로 실시예 1에서와 동일한 방법이 적용된 것이며, Mass electropherogram(도 4)으로도 확인되듯이 실제 토양 샘플에 포함되는 저농도의 분석 시료에 대하여도 고감도 분석이 가능하였다.

[75]

[76]

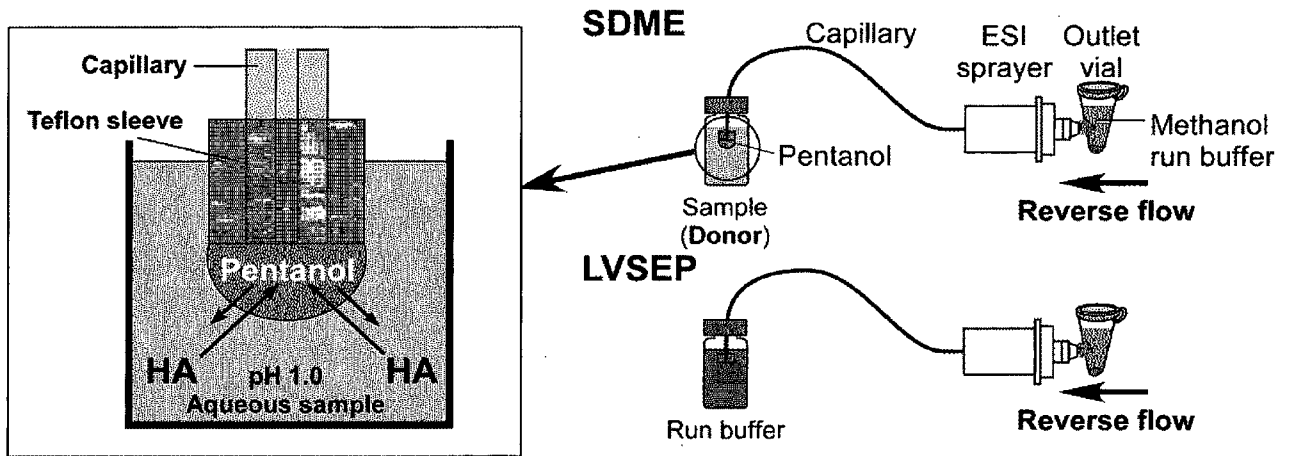
청구범위

- [청구항 1] a) 모세관에 런버퍼를 주입하여 채우는 단계;
 b) 질량분석기(MS)의 오리피스(orifice) 쪽의 모세관 아웃렛(outlet)에 런버퍼(run buffer)가 담겨진 아웃렛 저장용기를 두어 모세관 아웃렛이 잠기도록 하는 단계;
 c) 유기 엑셉터인 펜탄올을 모세관에 주입 후, 모세관의 인렛(inlet)부분을 도우너 용액(시료용액)에 담그는 단계;
 d) 모세관에 주입된 펜탄올을 모세관의 인렛부분쪽으로 끌어당겨 모세관의 인렛부분의 끝에 유기 방울을 형성하는 단계;
 e) 상기 도우너 용액으로부터 상기 방울내로 시료를 추출하는 단계;
 f) 시료가 농축된 방울내의 엑셉터 용액을 모세관에 주입하고, 모세관의 인렛부분을 런버퍼에 담그는 단계;
 g) 모세관의 인렛부분에 역전압을 걸어주어 추출된 시료를 스테킹하고, 모세관 전기영동의 전류변화를 관찰하여 전류의 변화가 급격히 일어날 때 상기 아웃렛 저장용기를 제거하는 단계; 및
 h) 질량분석기에서 시이쓰 용액(sheath liquid)을 흘려주고 전기분무 이온화 전압(electrospray ionization voltage: ESI voltage)을 가하여 스테킹된 농축시료가 질량분석기로 이동하도록 하는 단계;
 를 포함하는 것을 특징으로 하는, 단일 방울 미세추출법(SDME)과 전기삼투흐름펌프를 이용한 큰 부피 스테킹방법(LVSEP)을 CE-ESI-MS(모세관 전기영동-전기분무 이온화-질량분석기)와 연동함으로써 유기 방울로 추출된 시료의 스테킹, 분리 및 분석을 연속적으로 하는 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
 상기 모세관의 인렛부분은 소수성 지지체인 테프론 슬리브(Teflon sleeve)로 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
 상기 c) 단계에 있어서, 상기 도우너 용액에 적용되는 시료는 토양 오염물질인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서,
 상기 도우너 용액의 pH는 0.5 내지 2인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 1항에 있어서,
 상기 d) 단계에 있어서, 상기 방울을 형성하는 동안에, 모세관 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 런버퍼가 보충하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제 1항에 있어서,
 상기 g) 단계에 있어서, 전기삼투흐름(EOF)이 시료의 전기영동속도보다 작도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

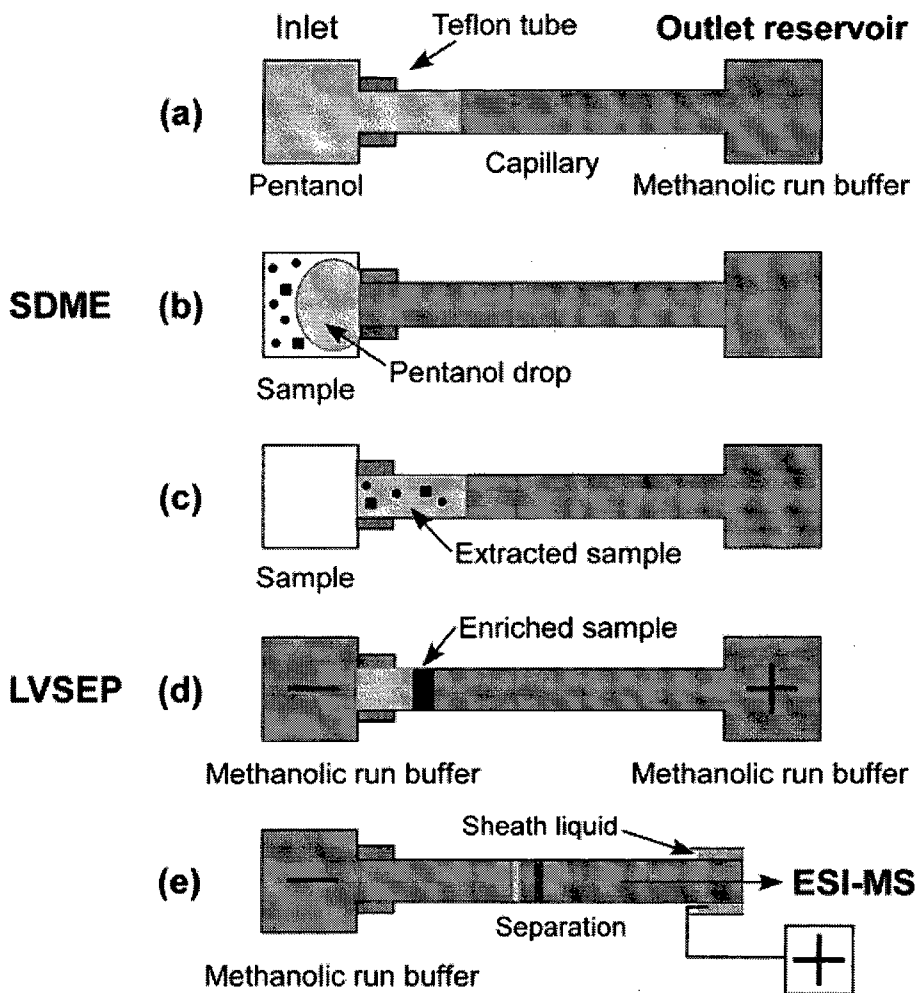
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,
상기 런버퍼는 비수용액성 용매를 버퍼로 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 비수용액성 용매는 메탄올인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 9] 제 6항에 있어서,
상기 런버퍼는 중성 또는 낮은 pH의 버퍼에 전기삼투흐름 변형제(EOF modifier)를 첨가하여 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 1항에 있어서,
상기 g) 단계에 있어서, 역전압을 걸어주어 시료를 스테킹하는 동안, 시료의 매트릭스인 펜탄올이 전기삼투흐름에 의해 모세관의 인렛부분쪽으로 제거되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 10항에 있어서,
상기 펜탄올이 전기삼투흐름에 의해 모세관의 인렛부분쪽으로 제거되는 동안에, 모세관 아웃렛 쪽의 컬럼의 비어가는 공간을 런버퍼가 보충하는 것을 특징으로 하는 방법.

【도면】

【도 1】

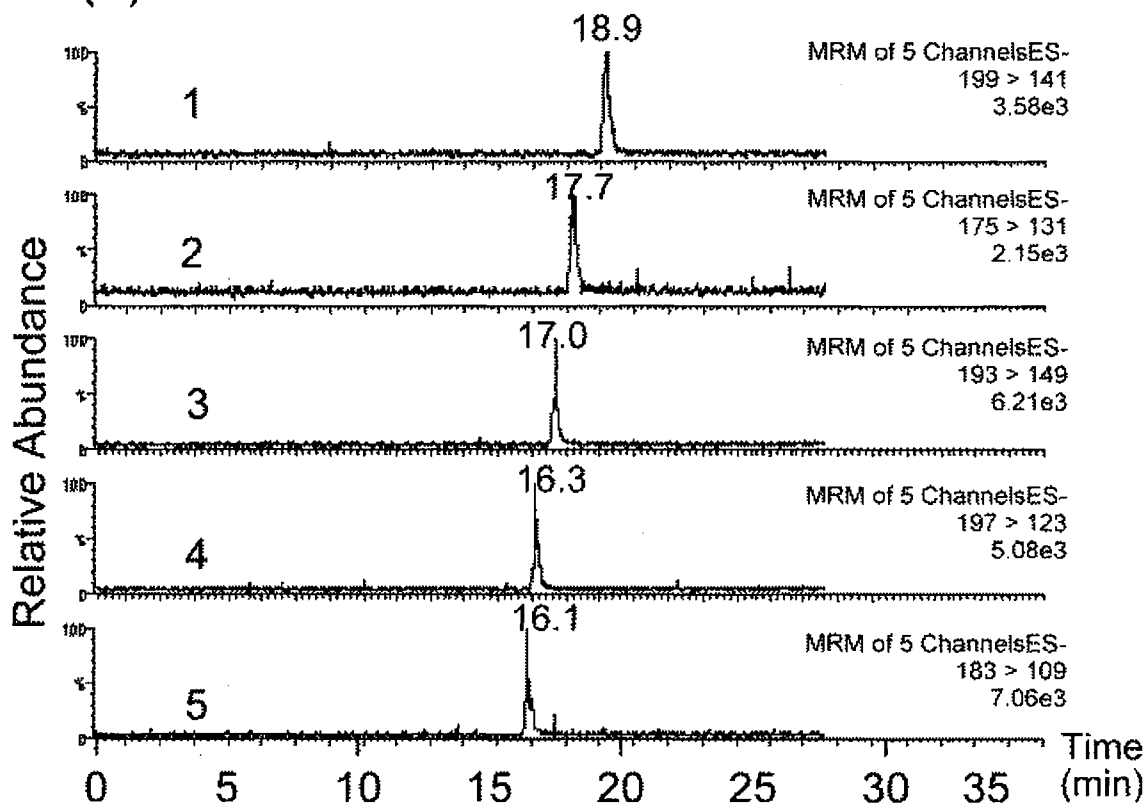


【도 2】

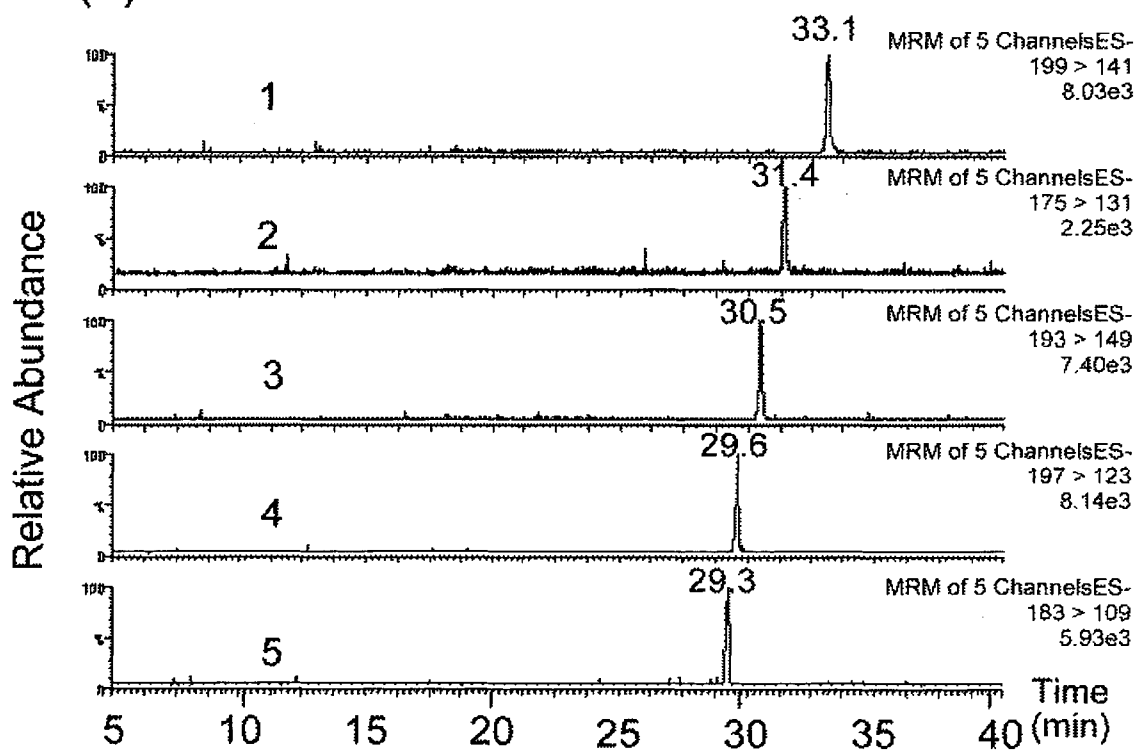


【도 3】

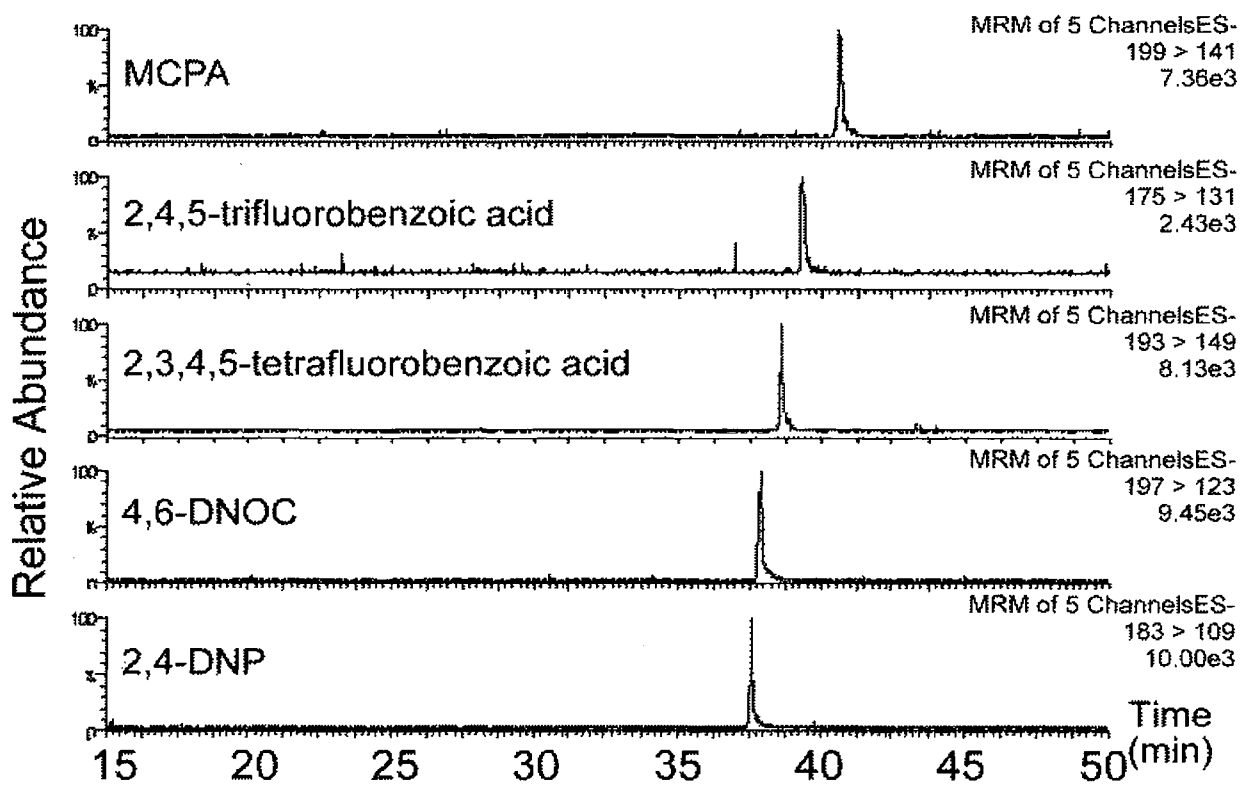
(a)



(b)



【도 4】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/015187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/447(2006.01)i, G01N 27/62(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/447; B05D 3/02; G01N 27/62; B05D 7/00; G01N 27/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: pentanol, extraction, single drop, stacking, capillary electrophoresis and mass spectrometry

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2011-0026658 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 16 March 2011 See abstract, paragraphs [0003], [0027], claim 2 and figure 1.	1-11
Y	CHOI et al., In-Line Coupling of Two-Phase Single Drop Microextraction and Large Volume Stacking Using an Electroosmotic Flow Pump in Nonaqueous Capillary Electrophoresis, Journal of Chromatography A., vol. 1216, no. 37, 05 August 2009 See abstract, pages 6467, 6468 and figures 1, 2.	1-11
Y	KR 10-2009-0007519 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 19 January 2009 See abstract and claims 1-5.	1-11
A	JP 2008-241244 A (OSAKA UNIV.) 09 October 2008 See figures 1, 2.	1-11
A	US 2005-0233085 A1 (MILLER et al.) 20 October 2005 See figures 1-4.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Date of mailing of the international search report

30 AUGUST 2017 (30.08.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/015187

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0026658 A	16/03/2011	KR 10-1160389 B1 WO 2011-031005 A2 WO 2011-031005 A3	26/06/2012 17/03/2011 23/06/2011
KR 10-2009-0007519 A	19/01/2009	KR 10-1144974 B1 WO 2009-011488 A1	11/05/2012 22/01/2009
JP 2008-241244 A	09/10/2008	WO 2007-007563 A1	18/01/2007
US 2005-0233085 A1	20/10/2005	US 6905031 B1 US 7125580 B2	14/06/2005 24/10/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 27/447(2006.01)i, G01N 27/62(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 27/447; B05D 3/02; G01N 27/62; B05D 7/00; G01N 27/26

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 펜탄올, 추출, 단일 방울, 스테킹, 모세관 전기영동 및 질량 분석

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2011-0026658 A (서울대학교산학협력단) 2011.03.16 요약, 단락 [0003], [0027], 청구항 2 및 도 1 참조.	1-11
Y	CHOI et al., In-Line Coupling of Two-Phase Single Drop Microextraction and Large Volume Stacking Using an Electroosmotic Flow Pump in Nonaqueous Capillary Electrophoresis, Journal of Chromatography A. 제1216권 제37호, 2009.08.05 요약, 페이지 6467, 6468 및 도 1, 2 참조.	1-11
Y	KR 10-2009-0007519 A (재단법인서울대학교산학협력재단 등) 2009.01.19 요약 및 청구항 1-5 참조.	1-11
A	JP 2008-241244 A (OSAKA UNIV.) 2008.10.09 도 1, 2 참조.	1-11
A	US 2005-0233085 A1 (MILLER et al.) 2005.10.20 도 1-4 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 08월 30일 (30.08.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이현길

전화번호 +82-42-481-8525



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0026658 A	2011/03/16	KR 10-1160389 B1 WO 2011-031005 A2 WO 2011-031005 A3	2012/06/26 2011/03/17 2011/06/23
KR 10-2009-0007519 A	2009/01/19	KR 10-1144974 B1 WO 2009-011488 A1	2012/05/11 2009/01/22
JP 2008-241244 A	2008/10/09	WO 2007-007563 A1	2007/01/18
US 2005-0233085 A1	2005/10/20	US 6905031 B1 US 7125580 B2	2005/06/14 2006/10/24