



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년05월04일

(11) 등록번호 10-2248106

(24) 등록일자 2021년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/72 (2006.01) G01N 13/02 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01) G01N 30/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 30/72 (2013.01)

G01N 30/8606 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0140880

(22) 출원일자 2019년11월06일

심사청구일자 2019년11월06일

(56) 선행기술조사문헌

CN105572259 A\*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

오한빈

경기도 고양시 일산동구 산두로175번길 26-6

이상탁

서울특별시 마포구 백범로 178 마포신영지웰 B1403

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 9 항

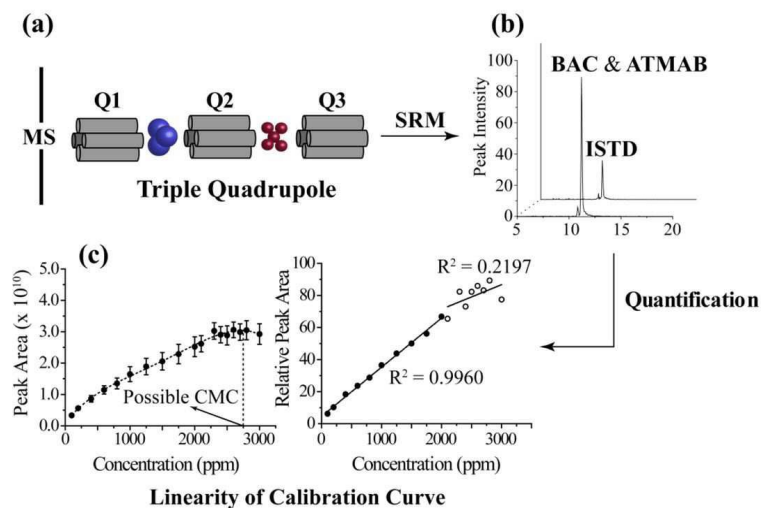
심사관 : 박성철

(54) 발명의 명칭 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 질량분석학적 방법

### (57) 요약

본 발명은 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

### 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 2013/0275 (2013.01)

G01N 2030/8854 (2013.01)

(72) 발명자

**김혜리**

경기도 성남시 중원구 성남대로 1000 센트럴타운3  
단지 313동 304호

**권정환**

서울특별시 서초구 잠원로3길 20 잠원2차 중앙하이  
츠아파트 B-1501

(56) 선행기술조사문헌

Sarah A. Burns 등, langmuir letter, 2009, 25  
권(19), 페이지 11244-11249.(2009.12.31.)\*

JP2009257961 A

JP2014202579 A

JP2523183 B2

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 K1180024908011000000000000

부처명 환경부

과제관리(전문)기관명 한국환경기술진흥원

연구사업명 위탁연구

연구과제명 살생물제 사차암모늄화합물 노출량 분석 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

계면활성제의 임계 미셀 농도(critical micelle concentration)를 측정하는 방법에 있어서,

- a) 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액을 준비하는 단계;
- b) 상기 계면활성제 용액 각각을 액체크로마토그래피-질량분석기에 주입하여 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제를 분리하고 각각의 용액의, 농도별 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및
- c) b) 단계에서 얻어진 질량분석 스펙트럼에서의 각각의 농도에 따른 검정곡선(calibration curve)을 구하여 이로부터 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 단계;를 포함하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 계면활성제는 탄소수가 6 내지 30인 소수성 알킬기 부분을 가지는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 c) 단계에서의 농도에 따른 검정선은 계면활성제의 농도에 따른 질량 피크의 면적을 구함으로써 얻어지는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 질량분석은 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)을 이용하는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

#### 청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 c) 단계에서의 임계 미셀 농도 측정은 검정곡선(calibration curve)상(上)에서 직선성(linearity) 추세 변화의 변화를 측정함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

#### 청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)은 적어도 두 개 이상의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

## 청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)은 3개의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

## 청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 a) 단계에서의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액은 5 내지 500 개의 범위로 시료를 준비하는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

## 청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 a) 단계의 계면활성제 용액은 각각에 내부 표준물질을 포함하는 것을 특징으로 하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0002]

### 배경 기술

[0003] 계면활성제 (surfactant)는 비누, 화장품 및 세제와 같이 수많은 생활화학제품에 첨가되어있는 화학물질로, 친수성 (hydrophilic)과 소수성 (hydrophobic)을 가지는 두 가지 다른 화학성질을 가지는 물질이 섞여있을 때, 그 상태를 안정적으로 유지해주기 위하여 첨가하는 물질이다.

[0004] 이러한 성질은 계면활성제의 구조적 특성에 기인한 것으로, 계면활성제는 크게 나누어 친수성을 가지는 머리(head)부분과 소수성을 가지는 꼬리(tail)부분으로 이루어져 있다. 특히 꼬리부분은 탄소사슬이 10개 이상 이어져있는 구조로 흔히 지질체(lipids)에서 흔히 관찰되는 구조를 지녀 친유성(lipophilic)을 가지게 된다.

[0005] 도 1은 액체내 계면활성제 농도 증가에 따른 계면활성제 분자의 구조적 특성 변화를 나타낸 그림이다. 계면활성제 분자들은 물속에 용해되어 있을 때, 특정 농도 이하에서는 균일하게 퍼져있지만 농도가 증가함에 따라서 물과 공기의 표면에 놓이게 된다. 친수성을 가지는 머리 부분은 물속에 위치하고 소수성인 꼬리 부분은 공기층에 위치하여 표면에 배열된다. 물-공기 표면에 배열된 계면활성제 분자가 포화상태에 이르게 되면 액체 내부에서 계면활성제 분자는 스스로 군집체를 이루게 되는데 이를 미셀 (micelle)이라고 하며, 상기 미셀의 형성이 시작하는 농도를 임계 미셀 농도 (critical micelle concentration: CMC)라고 하는데, 이는 계면활성제의 종류 및 소수성 탄소사슬의 길이에 따라서 그 농도가 모두 다르다.

- [0006] 이러한 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하기 위한 다양한 방법이 개발되었으며, 간단한 확인 방법으로는 3 가지 정도가 있다. 첫 번째로는 에멀션 (emulsion) 형성 후 상분리 상태로 돌아가는 시간을 측정하는 emulsion stability 방식이 있다 (Barney, R. and Carroll, J. Surfactant studies of quaternary ammonium compounds: Critical surfactant concentration. J. Surfactants. Deterg. 9(2) 137-140 (2006)). 이는 물과 기름 성분의 혼합액에 다른 농도의 계면활성제를 넣어준 후 교반시켜 에멀션을 형성시켜주고 이후에 다시 상분리 상태로 돌아가기까지의 시간을 측정하는 방식으로서, 임계 미셀 농도를 이상에서는 상분리 상태로 돌아가기까지의 시간이 일정하게 유지가 되는 특성을 이용한 방식에 해당한다.
- [0007] 두 번째로는 탈이온수 (deionized water)에 계면활성제를 농도별로 준비한 이후에 동일한 부피를 주사기에 넣은 후에 총 부피가 몇 번의 물방울로 떨어지는지를 확인하는 drop volume 방식이 있다. 계면활성제가 포함될 경우 물방울의 표면 장력이 떨어지는 특성을 이용한 임계 미셀 농도 측정법이라고 할 수 있다.
- [0008] 세 번째로는 특정 표면 위에서 다른 농도의 계면활성제 용액이 가지는 접적 면적이 달라짐을 이용한 contact area 측정 방식이 있다.
- [0009] 한편, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하기 위한 분광학적인 측정방식으로는 형광 프로브 (fluorescence probe)를 이용하는 방식이 있다. 이는 계면활성제가 포함된 액체 내부에 동일한 양의 형광 프로브를 첨가하였을 때 계면활성제의 농도 증가에 따라 형광 프로브의 단위체 (monomer) 방사 강도가 증가하는 특성을 이용하는 것으로, 상기 임계 미셀 농도 이후에는 이 형광 프로브의 단위체 방사 강도가 일정하게 유지되고 들뜬 이합체 (excimer)의 방사 파장이 점진적으로 증가하는 특성을 이용하며, 통상적으로 pyrene 계열의 형광 프로브를 사용하였으나 최근에는 다양한 형광 프로브가 개발되고 있다(Mohr, A., Talbiersky, P., Korth, H., Sustmann, R., Blümler, D. and Rehage, H. A new pyrene-based fluorescent probe for the determination of critical micelle concentrations. J. Phys. Chem. B. 111(45) 12985-12992 (2007)).
- [0010] 한편, 질량 분석법은 다양한 생체 물질과 고분자 및 저분자 물질의 식별 및 정밀하면서 높은 재현성을 가진 정량 연구에 사용되는 분석법으로서, 시료의 정량 및 정성분석에 다양한 방식으로 이용되고 있으며, 특히, 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기를 이용하는 경우에 시료의 분리가 짧은 시간내 용이하게 이루어지며, 또한 매우 낮은 농도의 물질도 분석이 가능할 수 있음과 동시에, 정밀하고 재현성이 있는 결과를 나타내주는 장점을 가지고 있으나, 이러한 질량분석법의 장점에도 불구하고, 아직까지 상기 질량분석법을 이용하여 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법이 개발되지 않은 실정으로, 매우 낮은 농도의 물질도 분석이 가능하며, 분리하고자 하는 시료를 매우 짧은 시간내 용이하게 분리할 수 있으며, 또한 보다 정밀하고 재현성이 있는 결과를 나타낼 수 있는 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정방법의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

[0011]

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 이에, 본 발명은 기체크로마토그래피-질량분석기 또는 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여, 매우 낮은 농도의 물질도 분석이 가능하며, 분리하고자 하는 시료를 매우 짧은 시간내 용이하게 분리할 수 있으며, 또한 보다 정밀하고 재현성이 있는 결과를 나타낼 수 있는 신규한 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정 방법을 제공할 수 있다.

[0013]

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기 과제를 해결하기 위해 본 발명은 계면활성제의 임계 미셀 농도(critical micelle concentration)를 측정하는 방법에 있어서, a) 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액을 준비하는 단계; b) 상기 계면활성제 용액 각각을 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기에 주입하여 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제를 분리하고 각각의 농도별 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 c) b) 단계에서 얻어진 질량분석 스펙트럼에서의 각각의 농도에 따른 검정곡선 (calibration curve)을 구하여 이로부터 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 단계;를 포함하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법을 제공한다.

- [0015] 일 실시예로서, 상기 a) 단계에서의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액은 5 내지 500 개의 범위로 시료를 준비할 수 있다.
- [0016] 바람직한 일 실시예로서 상기 a) 단계의 계면활성제 용액은 각각에 내부 표준물질을 포함할 수 있다.
- [0017] 또한 바람직한 일 실시예로서, 상기 계면활성제는 탄소수가 6 내지 30인 소수성 알킬기 부분을 가질 수 있다.
- [0018] 일 실시예로서, 상기 b) 단계에서의 각각의 계면활성제 용액은 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 각각의 농도별 질량분석 스펙트럼을 얻을 수 있다.
- [0019] 일 실시예로서, 상기 질량분석은 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)을 이용할 수 있다.
- [0020] 바람직한 일 실시예로서, 상기 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)은 적어도 두 개 이상의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0021] 보다 바람직한 일 실시예로서, 상기 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring)은 3개의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0022] 일 실시예로서, 상기 c) 단계에서의 농도에 따른 검정선은 계면활성제의 농도에 따른 질량 피크의 면적을 구함으로써 얻어질 수 있다.
- [0023] 바람직한 일 실시예로서, 상기 c) 단계에서의 임계 미셀 농도 측정은 검정곡선(calibration curve)상(上)에서 직선성(linearity) 추세의 변화를 측정함으로써 이루어질 수 있다.

[0024]

### 발명의 효과

- [0025] 본 발명은 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 계면활성제 각각의 농도 변화에 따른 피크면적 변화를 검정곡선으로 나타냄으로써 용이하게 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 것을 특징으로 하며, 본 발명에 따른 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정방법은 하나의 시료 분리 및 분석에 약 10분 내외의 시간이 소요됨에 따라 다량의 시료의 분석을 용이하게 할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명에 따른 측정법은 정밀하고 재현성이 있을 뿐만 아니라 계면활성제 자체를 분석하는 기법이기에 물에 물질 자체의 특성을 더 잘 반영할 수 있고, 다양한 계면활성제에 적용할 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명은 매우 낮은 농도의 물질도 분석이 가능한 고감도 분석법인 선택 반응 분석법으로 질량분석을 실시함에 따라 매우 낮은 농도(sub ppt level)의 임계 미셀 농도를 가지는 계면활성제 물질의 경우에도 손쉽게 분석이 가능한 장점이 있다.

[0028]

### 도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 계면활성제 농도 증가에 따른 계면활성제 분자의 구조적 특성 변화를 나타낸 그림이다.
- 도 2(a)는 본 발명에 따른 선택 반응 분석법에 의한 계면활성제 분석방법을 도식화하여 나타낸 예시적 도면이고, 도 2(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 분석대상물질과 내부표준물질의 액체 크로마토그래피-선택 반응 분석법 질량 스펙트럼이며, 도 2(c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 계면활성제의 농도에 따른 질량분석 스펙트럼의 검정곡선이다.
- 도 3(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 알킬의 탄소수( $C_n$ )가 12, 14, 16 및 18인 BAC 각각에 대한 추출 이온 크로마토그램이고, 도 3(b)는 BAC-C12에 대한 이온 분열 스펙트럼이며, 도 3(c)는 BAC(C12, C14, C16 및 C18) 각각에 대한 초고성능 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법/질량분석 스펙트럼이다.
- 도 4(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 알킬의 탄소수( $C_n$ )가 10, 12, 14, 16 및 18인 ATMA 각각에 대한 추출 이온 크로마토그램이고, 도 4(b)는 ATMA-C14에 대한 이온 분열 스펙트럼이며, 도 4(c)는 ATMA(C10, C12, C14, C16 및 C18) 각각에 대한 초고성능 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법/질량분석 스펙트럼이다.
- 도 5(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 BAC-C12의 농도 변화에 따른 절대 피크 면적을 나타낸 그래프이고, 도 5(b)는 BAC-12의 농도 변화에 따른 상대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6(a)는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATMA-B-C14의 농도 변화에 따른 절대 피크 면적을 나타낸 그래프이고, 도 6(b)는 본 발명의 일 실시예에 따른 ATMA-B-C14의 농도 변화에 따른 상대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0031] 본 출원의 발명자들은 종래기술에 따른 계면활성제 분석방법의 다양한 방식을 연구하고 이에 질량분석법을 도입하기 위한 다양한 연구를 시도하여, 놀랍게도 계면활성제가 임계 미셀 농도 이하의 농도일 때에는 농도 증가에 따른 질량분석기를 통해 얻은 질량 피크의 면적이 증가되는 반면, 임계 미셀 농도 이상일 때에는 첨가된 계면활성제가 미셀을 형성함에 따라 질량분석기를 통해 얻은 질량 피크 면적의 크기 증가가 매우 더디게 일어난다는 현상을 발견하게 되었으며, 이러한 현상에 따라 기체크로마토그래피-질량분석기 또는 액체크로마토그래피-질량분석기를 사용하여 임계 미셀 농도 전후에서의 계면활성제 농도 증가에 따른 질량 피크 면적의 증가 기울기의 차가 생기는 원리를 이용한 새로운 방법의 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정하는 방법을 개발하게 되었다.
- [0032] 즉, 본 발명은 계면활성제의 임계 미셀 농도(critical micelle concentration)를 측정하는 방법에 있어서, a) 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액을 준비하는 단계; b) 상기 계면활성제 용액 각각을 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기에 주입하여 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제를 분리하고 각각의 농도별 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 c) b) 단계에서 얻어진 질량분석 스펙트럼에서의 각각의 농도에 따른 검정곡선(calibration curve)을 구하여 이로부터 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 단계;를 포함하는, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0033]
- [0034] 먼저, 본 발명에 따른 a) 단계에서는 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제의 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액을 준비한다.
- [0035] 본 발명은 크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 측정하고자 하는 시료인 계면활성제의 복수의 농도별 질량 스펙트럼을 얻은 후, 농도별 상기 스펙트럼 피크 면적을 분석함으로써 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정할 수 있음에 따라, 상기 시료 농도를 달리한 복수의 계면활성제 용액은 5 내지 500개의 범위로 시료를 준비할 수 있고, 보다 바람직하게는 8 내지 200개의 범위로 시료를 준비하는 것이 바람직하다.
- [0036] 한편, 상기 복수의 계면활성제 용액은 계면활성제 성분에 추가하여 각각의 용액내에 내부 표준물질을 포함할 수 있고, 이러한 내부 표준물질을 도입함에 따라, 질량분석법의 정량적인 분석력이 향상되어, 보다 정확하게 임계 미셀 농도를 결정할 수 있게 된다.
- [0037] 이때 사용되는 내부 표준물질의 종류로서는 중수소 치환 벤잘코늄 (benzyl-2,3,4,5,6-d<sub>5</sub>-dimethyltetradecylammonium bromide), 중수소 치환 알킬트리메틸암모늄 계열로 n-Decyl-d21-trimethylammonium bromide, n-Dodecyl-d25-trimethylammonium bromide, n-tetradecyl-d29-trimethylammonium bromide, n-Hexadecyl-d33-trimethylammonium bromide 중에서 선택되는 1종이상의 물질이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 상기 benzyl-2,3,4,5,6-d<sub>5</sub>-dimethyltetradecylammonium bromide, n-tetradecyl-d29-trimethylammonium bromide 등의 중수소 치환된 물질이 사용될 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 내부 표준물질의 농도는 시료내 포함되는 분석대상인 계면활성제의 농도와 비교하여 0.1 내지 10 배의 몰비로 투입할 수 있다.
- [0039] 또한, 이때 상기 계면활성제는 탄소수가 6 내지 30인 소수성 알킬기 갖는 계면활성제를 사용할 수 있으며, 양이온, 음이온 또는 짝이온 계면활성제가 모두 사용될 수 있고, 보다 바람직하게는 상기 계면활성제가 알킬기의 탄소수가 10 내지 20인 염화 알킬디메틸벤질암모늄 클로라이드(alkyldimethylbenzylammonium chloride), 알킬기의 탄소수가 C가 10 내지 20인 알킬트리메틸암모늄 브로마이드(alkyltrimethylammonium bromide), 염화도데실피리듐(1-Dodecylpyridinium chloride), 염화세틸피리듐(Cetylpyridinium chloride), 테트라옥틸암모늄 브로마이드(Tetraoctylammonium bromide, TOAB), 1-헥산설포네이트 소듐염(1-Hexanesulfonate sodium salt), 헥실설포네이트 소듐염(Hexyl sulfate sodium salt), 1-옥탄설포네이트 소듐염(1-Octanesulfonate sodium salt), 1-데칸설포네이트 소듐염(1-Decanesulfonate sodium salt), 데실 설포네이트 소듐염(Decyl sulfate sodium salt), 디알

킬디메틸암모늄 클로라이드 계열로 디옥타데실디메틸암모늄 클로라이드 (dimethyldioctadecyl ammonium chloride) 및 디데실디메틸암모늄 클로라이드 (dimethyldidecyl ammonium chloride) 중 선택되는 어느 하나 이상인 것을 사용 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0040] 다음으로 본 발명의 b)단계에서는 상기 계면활성제 용액 각각을 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기에 주입하여 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제를 분리하고 각각의 농도별 질량분석 스펙트럼을 얻는다.
- [0041] 즉, 상기 농도를 달리한 계면활성제 용액 시료 각각은 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기에 주입되어 컬럼을 통해 순수한 계면활성제 성분만으로서의 분리과정을 거치게 되며, 이후 각각의 농도별 용액에 따른 계면활성제 성분이 질량분석기내에 투입됨으로써 질량분석 스펙트럼을 얻을 수 있다.
- [0042] 이때, 바람직하게는 크로마토그래피 장치로서, 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MASS)가 사용될 수 있고, 보다 바람직하게는 초고성능 액체 크로마토그래피(Ultra High Performance Liquid Chromatograph)를 사용할 수 있다.
- [0043] 한편, 상기 질량분석기(MASS Spectrometer)를 이용하여 얻어지는 질량스펙트럼은 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring, SRM)을 이용하여 얻어질 수 있다.
- [0044] 여기서, 상기 선택 반응 분석법(Selected Reaction Monitoring, SRM)이란, 시료의 질량-대-전하(Mass to charge, m/z)비율과 시료의 조각 이온과의 조합을 통하여 시료 선구(precursor) 이온의 선택과 충돌영역에서의 이온 조각화(fragmentation)이 유도되고 이들 생성이온 중 특정 m/z값을 가진 생성이온의 선택하여 검출하는 방식에 해당된다.
- [0045] 이를 위해서, 상기 선택 반응 분석법은 적어도 두 개 이상의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용할 수 있고, 보다 바람직하게는 3개의 사중극자 질량분석기의 결합을 이용하여 이루어질 수 있으며, 이때, 첫 번째 사중극자(Q1)에서는 분석을 진행코자 하는 선구 이온 (precursor ion)을 선택하게 되고, 선구 이온은 두 번째 사중극자(Q2)에서 에너지를 가하여 이온 조각화(파편화) (ion fragmentation)을 유도하며, 상기 이온 조각화를 통해서 유도한 생성이온 (product ion) 중 특정 이온을 선택하여 세 번째 사중극자 (Q3)에서 검출을 진행하게 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에 따른 상기 선택 반응 분석법에 의한 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법의 일 실시예를 도 2를 참고하여 설명한다.
- [0047] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 선택 반응 분석법을 이용한 임계 미셀 농도를 측정하는 방법을 도식화하여 나타낸 것이다.
- [0048] 보다 구체적으로, 도 2(a)는 본 발명의 선택 반응 분석법에 의한 계면활성제 분석방법을 도식화하여 나타낸 것으로서, 본 발명의 b) 단계에서 액체크로마토그래피-질량분석기 또는 기체크로마토그래피-질량분석기내에 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제 성분을 주입하고 이후에 상기 액체 또는 기체 크로마토그래피에 의해 분리된 후, 3중 사중극자 질량 분석기를 통하여 선택 반응 분석법에 의하여 특정 이온의 질량 분석 스펙트럼을 얻을 수 있다.
- [0049] 이때 상기 선택 반응 분석법은 3개의 사중극자 질량분석기가 결합한 3중 사중극자(triple stage quadrupole) 질량분석기에 의해 이루어지며, 분석을 진행하고자 하는 시료 선구 이온(precursor ion)의 선택, 이온 조각화(파편화)(ion fragmentation) 및 상기 이온 조각화를 통해서 유도된 생성이온(product ion) 중 특정 이온의 선택 및 검출을 진행하게 되며, 여기서, 상기 도 2(a)에서의 첫 번째 사중극자에서 선택되는 선구 이온은 임계 미셀 농도를 측정하고자 하는 계면활성제 성분으로서, 기체크로마토그래피 또는 액체크로마토그래피에서 분리되어 정제된 성분에 해당되며, 이를 두 번째 사중극자에서 이온충돌을 통해 조각화하며, 세 번째 사중극자에서 분석하고자 하는 특정 조각화된 이온 파편을 선택하여 검출할 수 있다.
- [0050] 한편, 본 발명의 b) 단계에서의 각각의 계면활성제 용액은 액체크로마토그래피-질량분석기를 이용하여 각각의 농도별 선택반응 분석법에 따른 질량분석 스펙트럼을 얻을 수 있고, 도 2(b)에서는 이에 따른 분석대상물질과 내부표준물질의 액체 크로마토그래피-질량 스펙트럼으로서, 계면활성제로서 벤잘코늄(BAC) 또는 알킬 트리메틸 암모늄(ATMAB)을 사용하여, 초고성능 액체 크로마토그래피-선택 반응 분석법(Ultra High Performance Liquid Chromatograph-Selected Reaction Monitoring, UPLC-SRM)에 따른 질량 스펙트럼을 나타내고 있다.
- [0051] 또한, 본 발명에 따른 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법에 있어서의 마지막 단계인 c)단계는 b) 단계에서 얻어진 질량분석 스펙트럼에서의 각각의 농도에 따른 검정곡선(calibration curve)을 구하여 이로부터

계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 것으로서, 보다 상세하게는 상기 c) 단계에서의 농도에 따른 검정선은 계면활성제의 농도에 따른 질량 피크의 면적을 구함으로써 얻어질 수 있다.

[0052] 이를 도 2(c)를 통하여 설명하면, 도 2(c)는 본 발명의 일 실시예에 따른 계면활성제의 농도에 따른 질량분석 스펙트럼의 검정곡선을 도시한 것으로, 이는 앞서의 b) 단계에서 얻어진 계면활성제 각각의 농도에 따른 질량분석 스펙트럼으로부터 계면활성제의 농도별 선택반응 분석법에 따른 질량 피크 면적을 구하고, 이를 검정곡선(calibration curve)으로 나타냄으로써, 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정할 수 있다.

[0053] 여기서, 상기 검정곡선을 통해 임계 미셀 농도를 측정하는 방식은 상기 검정곡선(calibration curve)상(上)에서 직선성(linearity) 추세의 변화를 측정함으로써 용이하게 이루어질 수 있다.

[0054] 일반적으로 검정곡선은 농도에 따라 직선성(linearity)을 가지는 구간이 존재하고 이 구간을 일반적인 정량분석에 사용하게 된다. 그림 2(c)에서 볼 수 있듯이 일정 농도 이상이 되어 물질이 포화상태에 이르게 되면 검정곡선의 직선성이 떨어지는 구간이 생기게 되는데 이러한 검정곡선의 특성을 이용하여 본 발명에서는 계면활성제의 임계 미셀 농도(CMC)를 도출할 수 있다.

[0055] 즉, 계면활성제의 임계 미셀 농도 전후에서는 계면활성제 농도 증가에 따른 질량 피크 면적의 증가 기울기의 차이가 매우 두드러지게 나타나게 되며, 이에 따른 검정선 상(上)에서 직선 추세의 변화를 측정함으로써 임계 미셀 농도를 측정할 수 있는 것이다.

[0056] 이때, 본 발명에서의 상기 농도에 따른 검정곡선은 통상적으로 적어도 일부가 직선 형태 직선성(linearity)을 나타내는 검정 직선을 포함하고 나머지 적어도 일부가 곡선형태로 나타내어지는 검정곡선을 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하는 방법은 정밀하고 재현성 있는 방법일 뿐만 아니라 계면활성제 자체를 분석하는 기법이기 때문에 계면활성제 물질 자체의 특성을 더 잘 반영할 수 있으며, 또한, 본 발명에 따른 선택 반응 분석법은 매우 낮은 농도의 물질도 분석이 가능한 고감도 분석법에 해당하여, 매우 낮은 농도(sub ppt level)의 임계 미셀 농도를 가지는 계면활성제 물질의 경우에도 용이하게 분석할 수 있는 장점을 가진다.

[0058]

[0059] 이하, 본 발명을 실시예로서 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060]

#### [0061] <실시예>

[0062] 계면활성제의 임계 미셀 농도를 파악하는 것은 제품이나 기타 시료에 포함되어 있는 계면활성제의 농도를 정확하게 파악하는데 필수적인 과정이라고 할 수 있으며, 이는 계면활성제의 농도를 정확하게 측정하기 위해서는 샘플을 희석하여 포함되어 있는 계면활성제가 임계 미셀 농도 이하로 그 농도를 떨어트려주는 과정이 필수적이기 때문이다. 본 연구에서는 대표적인 계면활성제인 벤잘코늄(Benzalkonium)과 알킬 트리메틸 암모늄(alkyltrimethylammonium)물질에 대해 본 발명에서 제시한 방법을 적용하였다.

[0063]

#### [0064] 시료 준비

[0065] 계면활성제로서 Sigma Aldrich사의 알킬의 탄소수(Cn)가 10, 12, 14, 16 및 18 인 알킬 트리메틸 암모늄(alkyltrimethylammonium bromide, ATMB)과 알킬의 탄소수(Cn)가 12, 14, 16, 18인 벤잘코늄(Benzalkonium chloride, BAC) 각각에 대해 농도를 10~5000 ppm으로 달리한 시료를 준비하였다.

[0066] 또한, 내부 표준물질로서 CDN Isotopes사의 중수소 치환 벤잘코늄(benzyl-2,3,4,5,6-d5-dimethyltetradecylammonium bromide, d5-BAB-C14)을 10ppm의 농도로 준비하였다.

[0067]

#### [0068] 측정장비

##### [0069] 1) 초고성능 액체 크로마토그래피

[0070] 초고성능 액체 크로마토그래피는 Thermo Scientific사의 Dionex Ultra 3000 UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatograph)를 사용하였으며, 이때 칼럼은 Acquity UPLCBEH C8 1.7 $\mu$ m(Waters사)를 사용하였으며,

용매로는 물:아세트나이트릴 (9:1 v/v)에 포름산 0.1% 및 암모늄 포메이트(ammonium formate) 5mM을 첨가한 용매 A 또는 아세트나이트릴:이소프로필알코올 (7:3)에 포름산 0.1%를 첨가한 용매 B를 사용하였다. 이때, 상기 포름산 및 암모늄 포메이트는 sigma aldrich사에서 구매하였으며, 상기 물, 아세트나이트릴, 이소프로필알코올은 대정화금에서 구매하였다.

## 2) 질량분석기

3중 사중극자 질량분석기로서 Thermo Scientific사의 TSQ(Triple Stage Quadrupole) Quantum Ultra를 이용하였다.

### 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정

#### (1) 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법 질량분석 스펙트럼

##### (a) 벤잘코늄 계면활성제

본 발명에 따른 질량분석에 의한 검정곡선으로 벤잘코늄 계면활성제의 임계 미셀 농도를 측정하기에 앞서, 벤잘코늄의 탄소 사슬 별 분리 및 개별 물질의 선구 이온에 충돌 에너지를 가하였을 때 형성되는 생성 이온들을 파악하여 선택 반응 분석법을 진행하기 위한 선행 연구를 수행하였다

이를 통해, 상기 선택 반응 분석법에 의한 질량분석을 위해, 알킬의 탄소수(Cn)가 12, 14, 16 및 18인 벤잘코늄(Benzalkonium chloride, BAC) 각각에 대한 액체크로마토그래피-질량분석을 실시하고, 그에 따른 스펙트럼을 분석하여 도 3에 나타내었다.

이를 참고하면, 알킬의 탄소수(Cn)가 12, 14, 16 및 18인 벤잘코늄(Benzalkonium chloride, BAC)을 각각 초고성능 액체크로마토그래피-3중 사중극자 질량분석기에 주입하여 상기 액체크로마토그래피로 상기 4종의 벤잘코늄 각각을 모두 분리하였고, 이는 도 3(a)의 추출 이온 크로마토그램(extracted ion chromatogram)에서 확인할 수 있다.

다음으로, 상기 분리된 4종의 벤잘코늄 각각을 선구 이온으로 하여 질량분석기에 각각에 해당하는 충돌 에너지를 가함으로써, 생성된 이온들로부터 선택 반응 분석법을 위한 생성 이온을 선택할 수 있었고, 그 중에서 탄소 사슬 12개를 가지는 물질 ( $m/z$  304.5)을 선택하여 임계미셀 농도를 확인하기 위한 실험을 진행하였고, 해당 물질이 이온 분열 스펙트럼을 도 3(b)에 도시하였다.

도 3(b)는 상기 액체크로마토그래피에 의해 분리된 4종의 벤잘코늄(BAC) 중 알킬기 탄소수가 12인 BAC-C12( $m/z$  304.5)에 대한 이온 분열 스펙트럼으로, 이는 상기 액체크로마토그래피에 의해 분리된 BAC-C12를 선구 이온으로 하여 3중 사중극자 질량분석기로 35V의 충돌 에너지를 가하여 얻어졌으며, 상기 이온 분열 스펙트럼에 있어서, 이온 피크의 면적이 가장 큰 이온( $m/z$  91.14)을 선택 반응 분석법을 위한 생성 이온으로 한다.

상기 C14, C16 및 C18인 벤잘코늄(BAC)과 내부 표준 물질( $d_5$ -BAB-C14)은 상기 BAC-C12에서 수행된 작업과 동일한 과정으로 각각 실시되어 선구 이온과 생성 이온의 mass-to-charge ratio 및 해당 생성 이온을 얻기 위한 최적의 충돌 에너지를 Thermo TSQ Quantum 소프트웨어를 통하여 확인하여 하기 표 1에 나타내었고, 각각의 벤잘코늄의 선택반응분석법 스펙트럼을 도 3(c)에 나타내었다.

표 1

|                                         | 탄소사슬 길이 | 선구 이온<br>( $m/z$ ) | 생성 이온<br>( $m/z$ ) | 충돌 에너지(V) |
|-----------------------------------------|---------|--------------------|--------------------|-----------|
| 벤잘코늄<br>(Benzalkonium<br>chloride, BAC) | 12      | 304.5              | 91.0               | 33        |
|                                         | 14      | 332.5              | 91.0               | 34        |
|                                         | 16      | 360.5              | 91.0               | 32        |
|                                         | 18      | 388.5              | 91.0               | 35        |
| 내부 표준물질<br>( $d_5$ -BAB-C14)            | 14      | 337.5              | 96.0               | 33        |

[0085] 상기 과정을 통하여, 도 3(c)에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 4종의 벤잘코늄에 대한 각각의 초고성능 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법/질량분석(UPLC-SRM/MS) 스펙트럼을 얻을 수 있었다.

[0086]

[0087] **(b) 알킬 트리메틸 암모늄 계면활성제**

[0088] 상기 벤잘코늄의 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법 질량분석 스펙트럼을 얻는 동일한 방법으로 알킬의 탄소수(Cn)가 10, 12, 14, 16 및 18 인 알킬 트리메틸 암모늄(alkyltrimethylammonium bromide, ATMA) 각각에 대한 액체크로마토그래피-질량분석을 실시하고, 그에 따른 스펙트럼을 분석하여 도 4에 나타내었다.

[0089] 보다 상세하게는, 도 4(a)는 상기 5종의 ATMA의 추출 이온 크로마토그램으로서, 상기 5종의 ATMA가 초고성능 액체크로마토그래피에 의해 모두 분리되었음을 확인할 수 있으며, 또한 도 4(b)에서는 상기 5종의 ATMA 중 알킬의 탄소수가 14인 ATMA-C14에 대한 이온 분열 스펙트럼으로, 이는 상기 이온 크로마토그램에 의해 분리된 ATMA-C14 을 선구 이온으로 하여 35V의 충돌 에너지를 가하여 얻어졌으며, 상기 이온 분열 스펙트럼에 있어서, 이온 피크의 면적이 가장 큰 이온(m/z 60.05)을 선택 반응 분석법을 위한 생성 이온으로 하였으며, 상기 C10, C12, C16 및 C18 인 ATMA와 내부 표준 물질(d<sub>5</sub>-BAB-C14)은 각각을 상기 ATMA-C14와 같은 과정으로 각각 수행하여 선구 이온과 생성 이온의 mass-to-charge ratio 및 해당 생성 이온을 얻기 위한 최적의 충돌 에너지를 Thermo TSQ Quantum 소프트웨어를 통하여 확인하여 하기 표 2에 나타내었고, 각각의 알킬 트리메틸 암모늄(alkyltrimethylammonium bromide, ATMA)의 선택반응분석법 스펙트럼을 도 4(c)에 나타내었다.

[0090]

**표 2**

[0091]

|                                                          | 탄소사슬 길이 | 선구 이온<br>(m/z) | 생성 이온<br>(m/z) | 충돌 에너지(V) |
|----------------------------------------------------------|---------|----------------|----------------|-----------|
| 알킬 트리메틸 암모늄<br>(Alkyltrimethylammonium<br>Bromide, ATMA) | 10      | 200.5          | 60.1           | 23        |
|                                                          | 12      | 228.5          | 60.1           | 25        |
|                                                          | 14      | 256.5          | 60.1           | 22        |
|                                                          | 16      | 284.5          | 60.1           | 34        |
|                                                          | 18      | 312.5          | 60.1           | 34        |
| 내부 표준물질<br>(d <sub>5</sub> -BAB-C14)                     | 14      | 337.5          | 96.0           | 33        |

[0092]

[0093] 상기 과정을 통하여, 도 4(c)에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 5종의 ATMA에 대한 각각의 초고성능 액체크로마토그래피-선택 반응 분석법/질량분석(UPLC-SRM/MS) 스펙트럼을 얻을 수 있었다.

[0094]

[0095] **(2) 검정곡선 분석을 통한 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정**

[0096] 본 발명에 따른 액체크로마토그래피-질량분석법을 이용한 계면활성제의 임계 미셀 농도 측정법은 개별 계면활성제의 농도 변화에 따른 절대 피크면적 및 상대 피크면적의 변화를 살펴봄으로써 가능하며, 이를 위해 본 발명에 따른 예시적 계면활성제로서, 12개의 탄소 사슬을 가지는 벤잘코늄(BAC-C12)과, 14개의 탄소사슬을 가지는 트리메틸 암모늄(ATMA-C14)을 선택하여 실험을 진행하였다. 상기 BAC-C12 은 농도를 100 ppm부터 5000 ppm까지로 샘플을 제조하였고, ATMA-C14 는 농도를 10 ppm부터 1500 ppm까지로 샘플을 제조하여, 초고성능 액체크로마토그래피-선택 반응 분석/질량분석(UPLC-SRM/MS) 시스템을 이용하여 농도에 따른 절대 피크면적 변화를 측정하였다.

[0097]

[0098] **(a) BAC-C12의 임계 미셀 농도 측정**

[0099] 도 5는 BAC-12의 농도 변화에 따른 (a) 절대 피크 면적과 (b) 상대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프이다.

[0100] 이를 참고하면, 5(a)는 BAC-12의 농도 변화에 따른 절대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프로, 농도가 100 ~

2700ppm일 때까지는 농도 증가에 따라 피크 면적이 지속적으로 증가하나, 2700ppm 이후부터는 농도 변화에 따른 피크 면적 증가가 미미함을 확인할 수 있다.

[0101] 이는, 농도 2700 ppm 이전에는 BAC-C12가 액체 내에 균일하게 분포하고 있어 동일한 부피 (2 $\mu$ l)를 주입하여 분석을 진행하여도 액체-공기 경계면에서 BAC-C12의 포화상태 및 미셀 형성 등으로 인한 피크 면적은 큰 증가 없이 비교적 일정하게 유지되나, 농도가 2700 ppm에 다르면 액체 내부의 BAC-C12가 포화상태로 되어 미셀을 형성함을 의미하는 것으로서, 상기 2700ppm을 임계 미셀 농도라 볼 수 있으며, 이는 기존에 보고된 BAC-C12의 임계 미셀 농도가 약 2600-2700 ppm으로 알려지고 있어, 본 발명의 검정곡선의 변화를 통해서 알아낸 임계 미셀 농도와 일치하는 것을 확인할 수 있다.

[0102] 한편, 일반적인 UPLC-SRM/MS 분석에서는 분석 도중 신호의 흔들림 현상에 따른 반복측정의 오류를 보정해주기 위하여 동일한 농도의 내부표준물질을 샘플에 투입한다. 그렇게 얻어지는 검정곡선은 일반적으로 농도 변화에 따른 상대 피크면적 (= 샘플 피크면적 / 내부표준물질의 피크면적)의 변화로 나타낸다. 하지만 도 5 (a)에서 얻어진 절대 피크 면적의 경우에도 반복 측정 (n = 3)에 따른 피크 면적의 상대 표준 편차도 0.8~14.5%로 본 분석법이 매우 재현성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0103] 여기서, 상기 편차는 하기 식 (1)에 의하여 측정될 수 있다.

[0104]

$$\text{피크면적의상대표준편차}(\%) = \frac{\text{절대피크면적의표준편차}}{\text{절대피크면적의평균}} \times 100$$

[0105] 식 (1)

[0106]

[0107] 또한, 상기 BAC-C12 농도에 따른 피크면적 분석에 있어서, 모든 샘플에 내부 표준물질(d<sub>5</sub>-BAB-C14)을 10 ppm 넣어서 상대 피크면적 변화도 측정하였고, 이를 도 5(b)에 나타내었다.

[0108] 상기 도 5(b)는 BAC-12의 농도 변화에 따른 피크면적을 내부 표준물질(d<sub>5</sub>-BAB-C14)에 의해 상대적으로 나타낸 그래프로, 임계 미셀 농도인 2700 ppm을 기점으로 하여 검정곡선 직선성의 변화는 물론이고, 기울기의 변화 또한 확인할 수 있다.

[0109] 이를 참고하면, 2700 ppm의 농도 이전에는 R<sup>2</sup>가 0.9951로 높은 직선성을 띄었으나 상기 농도 이후에는 R<sup>2</sup>가 0.6606으로 떨어지는 것을 확인할 수 있으며, 상기 2700ppm 농도를 기점으로 하여, 기울기가 0.031이었던 것이 0.021로 약 60% 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0110] 이는 2700ppm의 임계 미셀 농도 이후에는 농도 증가에 따른 피크면적 증가가 이전과 비교하여 비교적 더디게 일어나는 것을 확인할 수 있다.

[0111]

#### [0112] (b) ATMA-B-C14의 임계 미셀 농도 측정

[0113] 한편, 본 발명은 상기 BAC-C12뿐만 아니라, ATMA-B-C14에 대해서도 10 ~ 1500 ppm의 농도변화를 통해 임계 미셀 농도를 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0114] 상기 도 6은 ATMA-B-C14의 농도 변화에 따른 (a) 절대 피크 면적과 (b) 상대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프를 도시하였으며, 이를 참고하면, 6(a)는 ATMA-B-C14의 농도 변화에 따른 절대 피크 면적 변화를 나타낸 그래프로, 900 ppm을 기점으로 하여 농도에 따른 절대 피크 면적의 증가가 일어나지 않음을 확인할 수 있다.

[0115] 상기 900ppm은 ATMA-B-C14의 임계 미셀 농도로 알려진 1000ppm보다 낮은 수치이기는 하나, 도 6(b)의 내부 표준물질(d<sub>5</sub>-BAB-C14)을 사용하여 측정된 ATMA-B-C14의 상대 피크 면적 변화를 참고하면, 임계 미셀 농도 1000 ppm을 기준으로 하여 검정곡선 직선성이 변화하는 것을 확인 할 수 있다.

[0116] 즉, 상기 임계 미셀 농도(1000ppm) 이전에는 비교적 높은 직선성 (R<sup>2</sup>=0.9664)과 양의 기울기 값을 가졌던 반면에 임계 미셀 농도 이후에는 직선성이 감소 (R<sup>2</sup>=0.8221)함은 물론이고, 기울기도 0에 가깝게 형성된 것을 확인

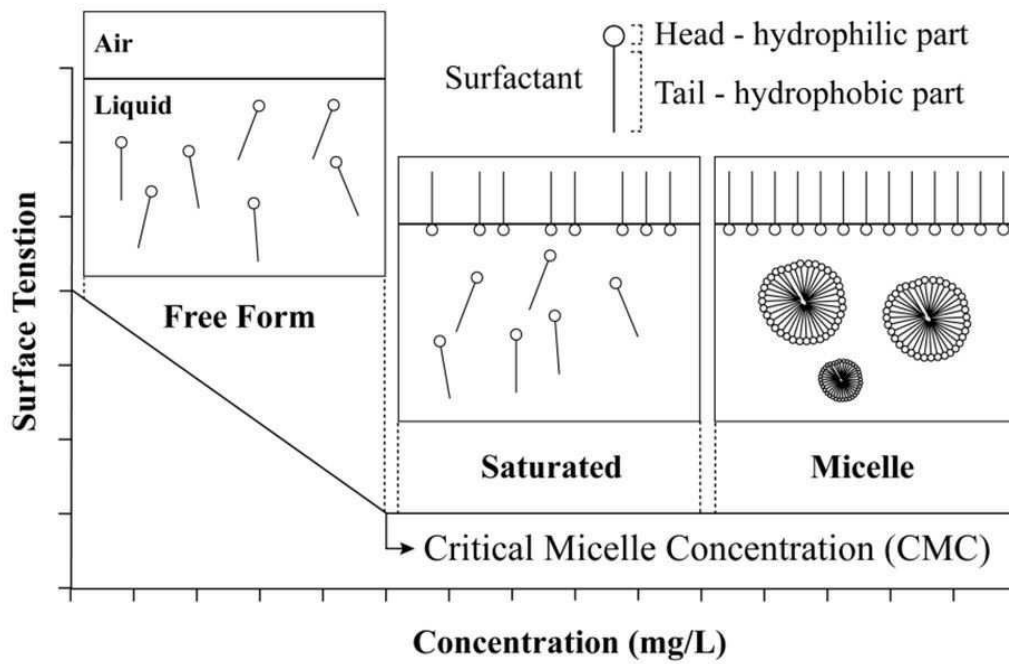
할 수 있고, 이는, 상기 임계 미셀 농도를 기점으로 ATMB-C14의 농도 증가에 따른 상대 피크 면적이 일정하게 유지됨에 따른 것이다.

[0117]

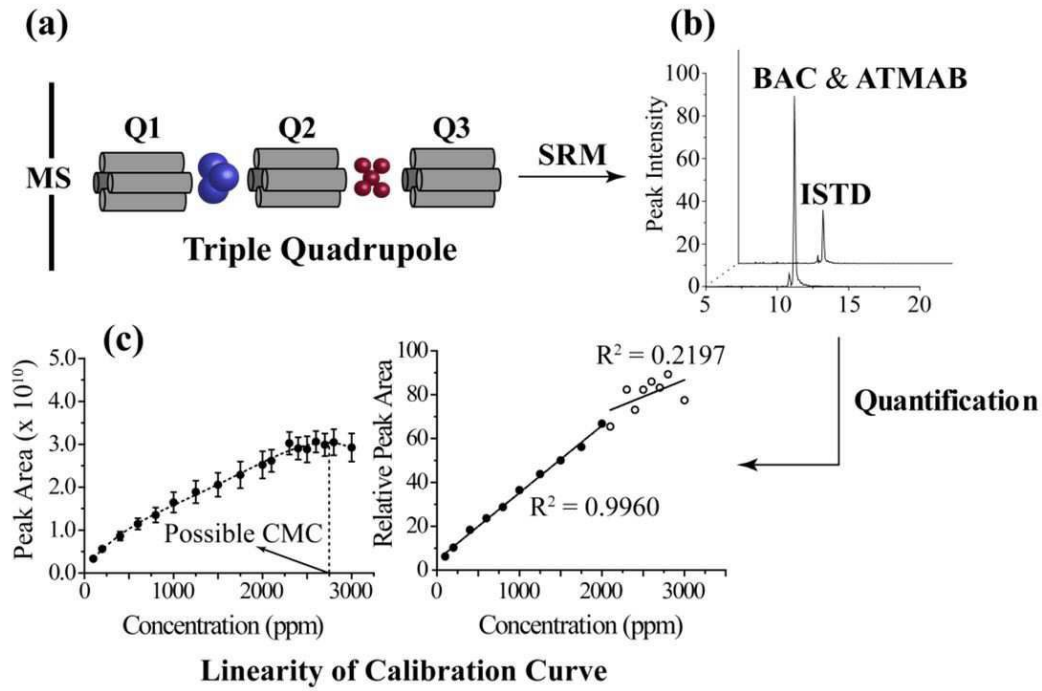
[0118] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술사상과 아래에 기재될 특허 범위의 균등범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

## 도면

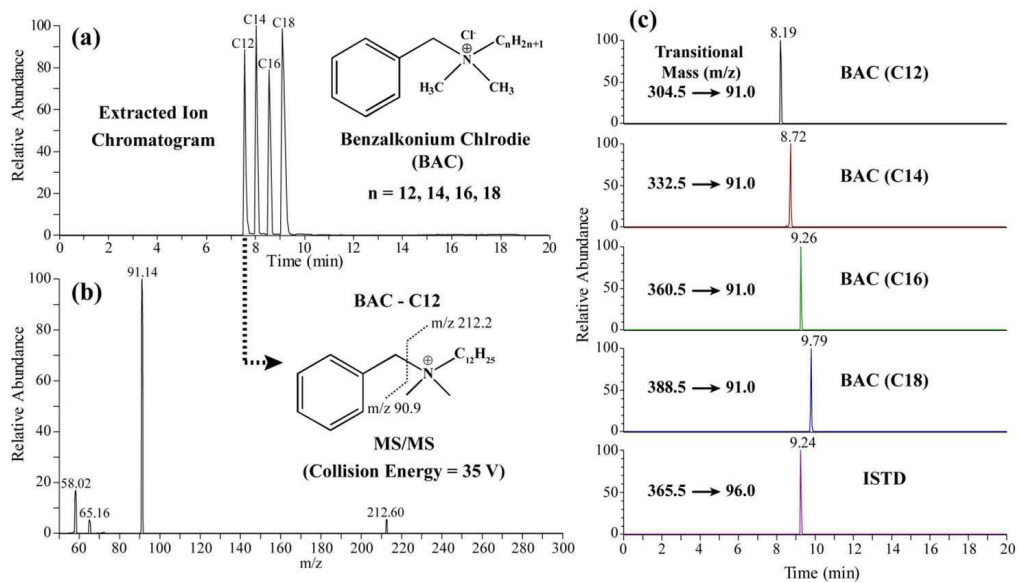
### 도면1



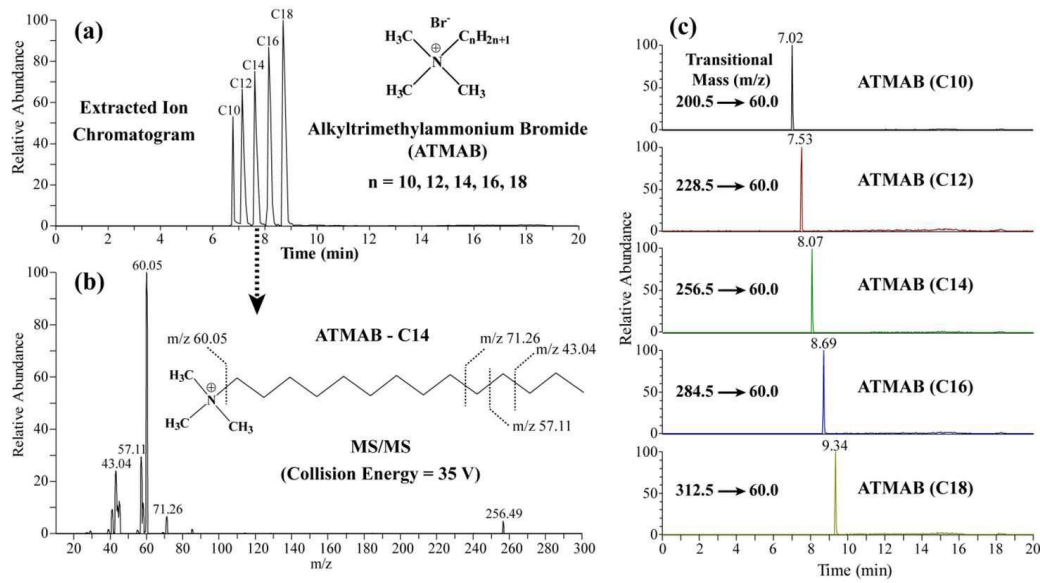
도면2



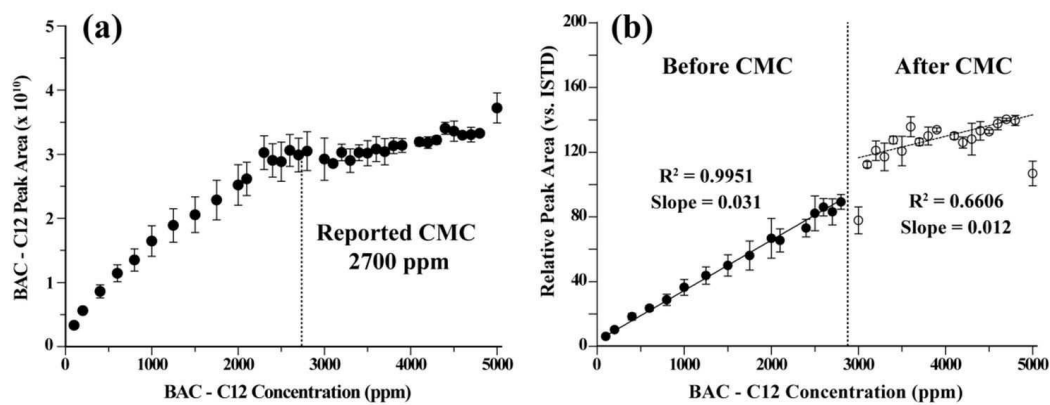
도면3



도면4



도면5



도면6

