(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0039825
(43) 공개일자 2024년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*G01N 30/86* (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)
*G01N 30/88* (2006.01) *G01N 30/96* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*G01N 30/86* (2013.01)
*G01N 30/96* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0118643
(22) 출원일자 2022년09월20일
심사청구일자 2022년09월20일

(71) 출원인
**세종대학교산학협력단**
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
**허진**
서울특별시 노원구 중계로 184, 107동 405호(중계동, 라이프청구신동아아파트)
**박태준**
서울특별시 광진구 아차산로 355, B동 1308호(자양동)
(74) 대리인
**특허법인리체**

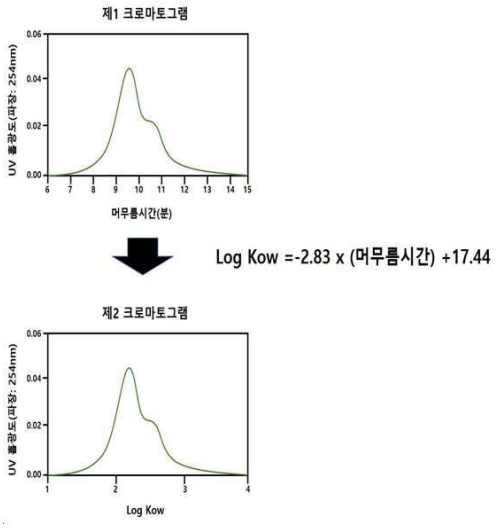
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **휴믹물질의 극성 특성 평가 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 친수성 상호작용 액체크로마토그래피(HILIC)로 측정된 머무름시간 분포를 활용하여 휴믹물질의 극성을 측정하고 이를 이용하여 휴믹물질의 특성을 평가하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 상기 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환한 후 도출한 평균 옥탄올-물 분배계수를 극성 지표로 활용함으로써, 휴믹물질 간 또는 다른 유기물과의 상대적 극성 크기를 비교하고 특성을 평가할 수 있는 방법에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*G01N 2030/027* (2013.01)
*G01N 2030/884* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1485018503 |
| 과제번호 | ARQ202001341003 |
| 부처명 | 환경부 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국환경산업기술원 |
| 연구사업명 | 수생태계 건강성 확보 기술개발사업 |
| 연구과제명 | 지문화 기술을 이용한 총 유기탄소(TOC) 기원 추적 기술 개발 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 과제수행기관명 | 세종대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2022.01.01 ~ 2022.12.31 |

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

휴믹물질을 포함하는 시료를 대상으로 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 수행하여 상기 휴믹물질을 구성하는 성분들의 머무름시간(RT) 분포를 얻는 단계;

상기 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환하는 단계; 및

상기 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균을 얻는 단계를 포함하는 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 머무름시간 분포는 시료의 HILIC 머무름시간(RT) 및 고정 검출 파장에 대한 크로마토그램인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

### 청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 고정 검출 파장은 254nm인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 머무름시간 분포에서 상기 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로의 변환은 하기 수학식 1을 이용하여 수행하는 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[수학식 1]

$$\text{Log Kow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

(식 중, RT는 머무름시간임).

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 휴믹물질 전구체 화합물의 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피 머무름시간 및 Log Kow을 변량으로 하는 검정곡선으로부터 하기 수학식 1의 회귀방적식을 얻는 단계를 더 포함하는, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[수학식 1]

$$\text{Log Kow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

(식 중, RT는 머무름시간임).

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 휴믹물질 전구체 화합물은 티민, 살리실산, 갈산, 아세나프텐, 페룰산, 페난트렌, 벤

조산 및 파이렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

**청구항 7**

청구항 1에 있어서, 상기 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균은 하기 수학식 2를 이용하여 얻는 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[수학식 2]

$$\text{평균 Log Kow} = \sum_{i=0}^{N}(x_i \times h_i) \Big/ \sum_{i=0}^{N} h_i$$

(식 중, $x_i$는 Log Kow 값, $h_i$는 Log Kow 값에 해당하는 흡광도 값임)

**청구항 8**

청구항 1에 있어서, 상기 HILIC의 이동상은 증류수와 아세토나이트릴이 1: 2 내지 3의 부피비로 혼합된 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 액체크로마토그램으로 휴믹물질의 극성을 측정하고, 이를 이용해 휴믹물질의 극성 특성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 휴믹물질(Humic substances)은 pH에 따른 용해도의 차이에 따라 휴믹산(humic acid), 풀빅산(fulvic acid), 휴민(humid) 등으로 구분되는 비균질 혼합물로서, 미생물의 물질대사에 의해 분해되어 자연적으로 생성되며 토양 및 지하수에 널리 분포하는 대표적인 친환경 유기 고분자 물질이다.

[0004] 모든 물 시료에는 휴믹물질이 존재하며 휴믹물질은 수처리 제어 효율을 비롯하여 수중 유기물과 관련한 환경 거동에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

[0005] 한편, 유기물의 극성은 유기물의 기능과 거동을 결정하는 매우 중요한 특성 중 하나이다. 유기물의 극성에 따라 이를 처리 방법이  달라지므로 유기물의 극성을 측정하는 것은 중요하나, 휴믹물질은 비균질적 특성으로 인해 이의 극성 값을 측정하는데 어려움이 있다.

### *선행기술문헌*

#### *특허문헌*

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1952243호

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0008] 본 발명은 비균질 혼합물인 휴믹물질의 새로운 극성 지표를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 휴믹물질의 새로운 극성지표를 이용해 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

## 과제의 해결 수단

[0011] 1. 휴믹물질을 포함하는 시료를 대상으로 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 수행하여 휴믹물질을 구성하는 성분들의 머무름시간(RT) 분포를 얻는 단계;

[0012] 상기 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환하는 단계; 및

[0013] 상기 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균을 얻는 단계를 포함하는 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

[0014] 2. 위 1에 있어서, 머무름시간 분포는 시료의 HILIC 머무름시간(RT) 및 고정 검출 파장에 대한 크로마토그램인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

[0015] 3. 위 2에 있어서, 고정 검출 파장은 254nm인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

[0016] 4. 위 1에 있어서, 머무름시간 분포에서 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로의 변환은 하기 수학식 1을 이용하여 수행하는 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[0017] [수학식 1]

[0018] $$\text{Log Kow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

[0019] (식 중, RT는 머무름시간임).

[0020] 5. 위 1에 있어서, 휴믹물질 전구체 화합물의 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피 머무름시간 및 Log Kow을 변량으로 하는 검정곡선으로부터 하기 수학식 1의 회귀방적식을 얻는 단계를 더 포함하는, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[0021] [수학식 1]

[0022] $$\text{Log Kow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

[0023] (식 중, RT는 머무름시간임).

[0024] 6. 위 5에 있어서, 휴믹물질 전구체 화합물은 티민, 살리실산, 갈산, 아세나프텐, 페룰산, 페난트렌, 벤조산 및 파이렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[0025] 7. 위 1에 있어서, 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균은 하기 수학식 2를 이용하여 얻는 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법:

[0026] [수학식 2]

[0027] $$\text{평균 Log Kow} = \sum_{i=0}^{N}(x_i \times h_i) \Big/ \sum_{i=0}^{N} h_i$$

[0028] (식 중, $x_i$는 Log Kow 값, $h_i$는 Log Kow 값에 해당하는 흡광도 값임)

[0029] 8. 위 1에 있어서, HILIC의 이동상은 증류수와 아세토나이트릴이 1: 2 내지 3의 부피비로 혼합된 것인, 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법.

## 발명의 효과

[0031] 본 발명의 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법을 통해 대상 휴믹물질을 대표하는 극성 값(평균 옥탄올-물

분배계수)을 측정할 수 있으며, 측정된 극성 값을 이용하여 광물과 유기오염물질에 대한 흡착력 등의 특성을 예측하고 수처리 제어에 활용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 제1 크로마토그램 및 이로부터 도출한 제2 크로마토그램을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수 사이의 상관관계에 관한 검정곡선 및 회귀방정식을 나타낸다(상단). 또한, 본 발명의 방법으로 얻은 평균 옥탄올-물 분배계수(Average log Kow)의 신뢰성 검증 결과를 나타낸다(하단). 평균 옥탄올-물 분배계수가 높을수록 소수성 유기 오염물질(HOC)에 대한 결합 친화도가 높고, 광물에 대한 흡착 친화도가 높음을 확인하였다.

도 3은 아세토니트릴 및 정제수를 70:30(v:v)의 부피비로 혼합한 이동상을 사용한 벤조산 및 살리실산의 HILIC 크로마토그램을 나타낸다(좌측). 또한, 수중 휴믹물질 샘플의 HILIC 머무름시간(RT)을 옥탄올-물 분배계수(Log Kow)로 변환하기 위해 휴믹물질 전구체 화합물을 사용하여 도출한 검정곡선을 나타낸다(우측).

도 4는 7개의 대표 휴믹물질 시료에 대해 254nm에서 UV 흡광도에서 측정한 HILIC 크로마토그램을 나타낸다. 크로마토그램의 머무름시간은 회귀방정식 을 사용하여 Log Kow 값으로 변환되었다. 7개의 대표 휴믹물질 시료(ESHA, PPHA, SRHA, SRFA, SRNOM, ESFA, MRNOM)의 HILIC 크로마토그램을 기반으로 계산된 평균 Log Kow 값과 (O+N)/C 원소 비율과의 상관관계를 나타낸다.

도 5는 (a)강물 휴믹물질과 (b)방류된 폐수 휴믹물질의 HILIC 크로마토그램을 나타낸다.

도 6은 (a) 평균 옥탄올-물 분배계수(log Kow)와 파이렌 결합계수(Log Koc)와의 상관관계 및 (b) 평균 옥탄올-물 분배계수(log Kow)와 카올리라이드 흡착률과의 유의한 상관관계를 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명은 친수성 상호작용 액체크로마토그래피(HILIC)로 측정된 휴믹물질의 머무름시간(Retention time, RT) 분포를 옥탄올-물 분배계수 분포로 변환하고, 이의 평균을 도출하여 휴믹물질의 극성 지표로 활용함으로써, 휴믹물질의 극성 관련 특성을 평가하는 방법에 관한 것이다.

[0035] 휴믹물질은 유기물들이 오랜 세월 분해, 축합, 중합 및 산화되어 형성된 고분자 화합물들을 성분으로 하는 비균질 혼합물이다.

[0036] 본 발명의 휴믹물질 극성 특성 평가방법을 이용해 휴믹물질이 포함된 시료의 평균 옥탄올-물 분배계수(대표 극성 지표)를 알 수 있으며, 이를 공지된 유기 화합물들의 옥탄올-물 분배계수와 비교함으로써 해당 휴믹물질의 상대적 극성 크기를 알 수 있다. 또한, 상대적 극성 크기를 이용하여 해당 휴믹물질의 극성과 관련된 특성을 평가할 수 있다.

[0037] 극성과 관련된 휴믹물질의 특성은 i) 광물과 나노물질에 대한 흡착력 및 흡착으로 인한 입자 표면의 특성 변화 유도, ii)중금속과 유기오염물과의 결합력 iii)응집침전 또는 막 여과와 같은 수처리 공정 처리 효율 등이 있다.

[0038] 본 발명은 휴믹물질을 포함하는 시료를 대상으로 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피(HILIC)를 수행하여 상기 휴믹물질을 구성하는 성분들의 머무름시간(RT) 분포를 얻는 단계; 상기 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환하는 단계; 및 상기 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균을 얻는 단계를 포함하는 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법을 제공한다.

[0039] 머무름시간 분포는 HILIC를 수행하여 얻어진 머무름시간을 한 축으로 하는 크로마토그램으로, 검출기의 종류에 따라 나머지 축은 달라질 수 있다. 예컨대 UV-vis 검출기 또는 PDA(Photodiode Array)검출기를 이용하여 고정 검출 파장에 대한 흡광도를 측정할 수 있으며 이 경우 x축은 머무름시간이고 y축은 고정 검출 파장에 대한 흡광도이다.

[0040] 고정 검출 파장은 검출기를 통해 검출하려는 특정 영역 파장으로, 예컨대 254nm일 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에서 PDA 검출기를 사용하여 254nm 고정 파장에서의 흡광도를 측정함으로써, 머무름시간을

x축으로 하고 고정 검출 파장(254nm)의 흡광도를 y축으로 하는 크로마토그램을 얻었다.

[0042] 본 발명의 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법에 사용하는 HILIC의 이동상은 물과 아세토니트릴의 혼합물일 수 있다. 물과 아세토니트릴의 혼합 부피비는 1: 2 내지 3 또는 1: 2 내지 2.5일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서 물과 아세토니트릴을 30:70(v/v)비율로 혼합한 이동상을 사용하였을 때 휴믹물질 분리능이 가장 우수함을 확인하였다.

[0043] 본 발명의 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법에서 HILIC 이동상의 유속은 0.1 내지 0.3 mL/min일 수 있다.

[0044] 본 발명의 휴믹물질의 극성 특성 평가 방법에서 HILIC에 주입하는 시료량은 50 내지 150 μL 또는 80 내지 120 μL일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실시예에서 HILIC 이동상의 유속은 0.2 mL/min, 주입 시료량은 100 μL로 하여 크로마토그램을 얻었다.

[0046] 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환하는 것은 HILIC 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수의 상관관계에 대한 검정곡선(calibration curve)을 이용하는 것일 수 있다.

[0047] HILIC 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수의 상관관계에 대한 검정곡선과 회귀방정식의 도출은 공지의 방법을 이용할 수 있다.

[0048] HILIC 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수의 상관관계에 대한 검정곡선은 휴믹물질 전구체 화합물의 HILIC 머무름시간(크로마토그램의 피크에 해당되는 머무름시간)과 옥탄올-물 분배계수의 상관관계로부터 도출된 것일 수 있다.

[0049] 휴믹물질 전구체 화합물은 티민, 살리실산, 갈산, 아세나프텐, 페룰산, 페난트렌, 벤조산 및 파이렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 실시예에서 티민, 살리실산, 갈산, 아세나프텐, 페룰산, 페난트렌, 벤조산 및 파이렌의 HILIC 머무름시간(크로마토그램의 피크에 해당되는 머무름시간)과 옥탄올-물 분배계수의 상관관계로부터 도출된 검정곡선은 도 2의 검정곡선과 같다. 위 화합물들의 머무름시간은 아세트로니트릴과 증류수 혼합물 (아세토니트릴:증류수=70:30(v/v))인 이동상으로 HILIC를 수행하여 측정하였으며, 옥탄올-물 분배계수는 공지된 수치를 이용하였다(표 3).

[0051] 머무름시간 분포를 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포로 변환하는 것은 예컨대 도 1과 같이 회귀방정식을 이용해 머무름시간에 대한  제1 크로마토그램을 옥탄올-물 분배계수(Log Kow)에 대한  제2 크로마토그램으로 변환하는 것일 수 있다.

[0052] 본 발명의 휴믹물질의 특성 평가 방법은 휴믹물질 전구체 화합물의 HILIC 머무름시간(피크에 해당하는 머무름시간)과 옥탄올-물 분배계수를 변량으로 하는 회귀방적식을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다. 예컨대 티민, 살리실산, 갈산, 아세나프텐, 페룰산, 페난트렌, 벤조산 및 파이렌의 HILIC 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수를 변량으로 하는 하기 수학식 1의 회귀방정식을 얻는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0053] [수학식 1]

[0054] $$\text{Log Kow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

[0055] 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포의 평균을 얻는 단계에서 평균 옥탄올-물 분배계수(평균 Log Kow)는 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 분포에서 각 Log Kow 값에 대응되는 흡광도 값을 고려한 Log Kow 값의 산술평균이다.

[0056] 평균 Low Kow는 하기 수학식 2와 같이 각 Log Kow 값에 해당하는 흡광도 값($h_i$)과 Log Kow 값(xi)의 곱에 대한 적분 값을 hi의 적분값으로 나눔으로써 얻을 수 있다:

[0057] [수학식 2]

[0058] $$\text{평균 Log Kow} = \sum_{i=0}^{N}(x_i \times h_i) \Big/ \sum_{i=0}^{N} h_i$$

[0059] (식 중, $x_i$는 Log Kow 값, $h_i$는 Log Kow 값에 해당하는 흡광도 값임)

[0061] **실시예**

[0062] **1. HILIC 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수의 상관성 분석 및 검정곡선 도출**

[0063] 8개의 휴믹물질 전구체 화합물 이용하여 머무름시간과 옥탄올-물 분배계수(Log Kow) 사이의 상관성 분석을 진행하였다.

[0065] **1.1. 재료 및 방법**

[0066] 휴믹물질(Humic Substances, HS)이 포함된 용액의 제작을 위해 International Humic Substances Society (IHSS)에서 다음과 같은 대표적인 7개 휴믹물질 샘플을 구매하였다. 엘리엇 토양 휴믹산(Elliott Soil Humic Acid, ESHA), 스와니강 휴믹산(Suwanee River Humic Acid, SRPA), 파호키 이탄 휴믹산(Pahokee Peat Humic Acid, PPHA), 엘리엇 토양 풀빅산(Elliott Soil Fulvic Acid, ESFA), 스와니강 풀빅산(Suwanee River Fulvic Acid, SRFA), 스와니강 천연 유기물(Suwanee River Natural Organic Matter, SRNOM) 및 미시시피 강 천연 유기물(Mississippi River Natural Organic Matter, MRNOM).

[0067] 위 휴믹물질들은 IHSS(www.humicsubtances.org)에서 제공하는 원소 조성에서 계산된 (O + N)/C 비율(즉, 원소 극성 지수)을 기반으로 선택되었다. 위 휴믹물질들의 원소 조성비는 다음 표 1 및 2와 같다.

*표 1*

[0068]

| 휴믹샘플 | Cat. No. | 원소조성 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C (%) | H (%) | O (%) | S (%) |
| SRHA | 3S101H | 54.59 | 3.9 | 40.03 | 1.5 |
| ESHA | 5S102H | 58.75 | 3.68 | 32.9 | 4.22 |
| PPHA | 1S103H | 56.37 | 3.82 | 37.34 | 3.69 |
| SRFA | 2S101F | 52.34 | 4.36 | 42.98 | 0.67 |
| ESFA | 5S102F | 51.92 | 3.91 | 39.64 | 2.4 |
| SRNOM | 2R101N | 50.7 | 3.97 | 41.48 | 1.27 |
| MRNOM | 1R110N | 49.98 | 4.61 | 41.4 | 2.36 |

*표 2*

[0069]

| 휴믹샘플 | $^{13}$C NMR 측정 탄소 분포(%) | | | | | | | 분자량 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Carbonyl | Carboxyl | Aromatic | Acetal | Hetero aliphatic | Aliphatic | Aromaticity | MWw (Log Da) |
| SRHA | 3.90 | 12.80 | 35.30 | 8.90 | 13.40 | 23.90 | 43.31 | 3.57 |
| ESHA | 1.00 | 14.80 | 48.30 | 5.10 | 9.60 | 16.20 | 60.98 | 4.26 |
| PPHA | 5.00 | 20.00 | 47.00 | 4.00 | 5.00 | 19.00 | 62.67 | 3.83 |
| SRFA | 5.00 | 17.00 | 22.00 | 6.00 | 16.00 | 35.00 | 27.85 | 3.30 |
| ESFA | 2.50 | 17.50 | 33.30 | 5.70 | 13.90 | 24.20 | 43.19 | 4.03 |
| SRNOM | 8.00 | 20.00 | 23.00 | 7.00 | 20.00 | 37.00 | 26.44 | 3.28 |
| MRNOM | 3.00 | 14.00 | 19.00 | 7.00 | 20.00 | 37.00 | 22.89 | 3.17 |

[0070] HILIC 측정을 위한 휴믹물질 용액은 100ml의 알칼리성 정제수(Mill-Q water, pH = ~9)에 각 동결 건조된 휴믹물질 20mg을 용해하여 제조했다. 그런 다음 용액을 미리 세척한 셀룰로오스 아세테이트 필터(공극 크기: 0.2㎛, Advantec)를 통해 여과했다. 0.1M HCl을 사용하여 pH를 ~3.0으로 재조정하였다.

[0071] 또한, 추가 휴믹물질 샘플은 강물(한강, 37° 31' 43" N, 127° 04' 01" E) 및 폐수 방류수(한국 서울의 도시

폐수 처리 시설)에서 휴믹물질 분획을 분리하여 얻었다. 두 샘플은 자연계에서 일반적으로 발견되는 수생 유기물에서 분리된 휴믹물질을 나타낸다. 수집된 샘플은 미리 세척된 셀룰로오스 아세테이트 필터(기공 크기: 0.2 μm, Advantec)를 통해 여과되었다. 그런 다음 0.1N HCl을 사용하여 pH 2로 산성화하고 각 샘플 1리터를 15ml 부피의 세척된 DAX-8 수지(Supelite)로 채워진 컬럼에 통과시켰다(van Zomeren and Comans, 2007). 그 후 0.1N NaOH 용액 100ml를 이용하여 수지에 흡착된 DOM 분획을 용출시켰다. 용출된 용액을 양이온 교환 수지(Amberlite)에 통과시켜 최종 휴믹물질 분획을 얻었다.

[0073] **1.2. 용존 유기 탄소(DOC) 및 분광 측정**

[0074] 휴믹물질 샘플의 DOC 농도는 TOC 분석기(TOC-VCHP, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정되었다. 흡수 스펙트럼은 UV-가시광 분광 광도계(UV-1800, Shimadzu, Japan)를 통해 1nm 간격으로 200nm에서 600nm 범위의 파장에서 1cm 석영 셀(독일 Hellma)에서 얻었다. 형광 여기 방출 매트릭스(EEM)는 발광 분광 광도계(F-7000, Hitachi, Japan)를 사용하여 스캔되었다. 측정된 파장 범위는 여기(Ex)의 경우 220~500nm, 방출(Em)의 경우 280~550nm로 설정되었으며 각 스캔 단계는 각각 5nm 및 1nm다. 254 nm에서 UV 흡수 계수가 <0.05 $cm^{-1}$에 도달할 때까지 샘플을 정제수(Milli-Q water)로 희석함으로써 내부 필터 보정을 생략했다.

[0076] **1.3. HILIC 설정 및 작동 조건 최적화**

[0077] PDA 검출기(PAD 2998, Waters, USA)가 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)(e2695, Waters, USA)가 HILIC의 메인 시스템으로 사용되었다. HILIC 시스템에는 Waters Company(USA)에서 구입한 Atlantis 실리카 충전 컬럼(100Å, 5 μm, 4.6 mm × 150 mm I.D.)을 사용했다. 이동상은 아세토니트릴 또는 메탄올(99.9%, Aldrich)과 정제수를 50:50, 60:40, 70:30 및 80:20의 혼합 비율로 혼합하여 제조했다. 이동상이 다른 혼합비로 바뀔 때마다 컬럼을 1시간 동안 조절하였다. 유속과 시료 주입량은 각각 0.2ml/min 및 100μl로 설정되었다. 검출 파장은 254nm로 고정되었으며, 스캔 시간은 0.1분으로 설정되었다.

[0079] **1.4. 파이렌 결합 실험**

[0080] 휴믹물질의 소수성 유기 오염물질(hydrophobic organic contaminants, HOC) 결합 계수는 휴믹물질의 소수성 특성과 양의 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다(Mei, Y., Bai, Y. & Wang, L. Effect of pH on binding of pyrene to hydrophobic fractions of dissolved organic matter (DOM) isolated from lake water. Acta Geochim 35, 288-293 (2016)). 파이렌(Aldrich, 99%)은 HOC 모델로 사용되었다. 저장용 용액(stock solution)은 100ml의 메탄올(Aldrich, 99%)에 파이렌(0.012g)을 용해하여 120mg/L 농도로 제조했다. 결합 실험을 위해 용존유기탄소(DOC) 농도를 15mg C/L, 휴믹물질 용액의 pH를 중성(6.8)으로 조정한 후 각 휴믹물질 샘플에 최소 부피(0.1%)의 저장용 용액 용액(120mg/l)을 첨가했다. 위 샘플을 진탕기에서 저속(150rpm)으로 밤새 혼합했다. 평형이 확립된 후, 혼합 샘플의 형광 강도는 477 nm/376 nm의 Ex/Em 파장에서 측정되었다. 내부 필터 보정은 두 파장에서 샘플의 흡수 계수를 고려하여 이루어졌다. 실험은 3중으로 엠버 바이알을 사용하여 수행되었다.

[0081] 파이렌과 휴믹물질 사이의 평형 관계는 아래에 설명된 바와 같이 소위 유기 탄소(OC)-정규화 결합 계수(Koc)에 의해 정의되었다.

[0082] $$K_{oc} = \frac{[\mathrm{pyr}] - [\mathrm{Pyr_{free}}]}{[\mathrm{pyr_{free}}][\mathrm{HS}]} = \frac{[\mathrm{pyr - HS}]}{[\mathrm{pyr_{free}}][\mathrm{HS}]}$$

[0083] 여기서 [$Pyr_{free}$]는 자유 용존 파이렌 농도(μg/l), [pyr-HS]는 휴믹물질과 결합된 파이렌의 농도(μg/l)를 나타낸다. [pyr-HS]는 초기에 첨가된 파이렌 농도([Pyr], 120 μg/l)에서 자유 용존 파이렌 농도([$pyr_{free}$])를 빼서 구했다. [HS]는 파이렌과 결합된 휴믹물질이 처음 휴믹물질에 비해 무시할 수 있다고 가정할 때 초기 휴믹물질 샘플의 DOC 농도(mg C/l)로 표현될 수 있다. 이 연구를 위해 수정된 형광 소광법을 적용하여 [$pyr_{free}$]를 정량화했으며, 여기서 측정된 형광 강도는 휴믹물질이 없는 외부 파이렌 보정 곡선을 사용하여 [$pyr_{free}$] 농도로 변환되었다.

[0085] **1.5. 휴믹물질의 광물 흡착 실험**

[0086] 휴믹물질 흡착 실험은 다양한 휴믹물질의 광물 흡착 경향을 조사하기 위해 수행되었다. 본 연구에서는 카올리나이트(미국 Aldrich)를 모델 광물 흡착제로 사용하였으며, 소수성 상호작용을 통한 휴믹물질의 흡착을 유도하였다. 카올리나이트의 0전하 지점은 약 3.0으로 보고되었으며 이는 중성 pH 범위에서 광물의 순 음의 표면 전하를 나낸다. 흡착 실험을 위한 초기 휴믹물질의 농도는 5.0 mg C/l이었고, 0.1 N HCl 또는 1.1 N NaOH를 사용하여 pH 값을 7.0으로 조정하였다. 카올리나이트 덩어리(0.4g)를 엠버 바이알에서 40ml의 각 휴믹물질 용액(5mg C/l)과 혼합했다. 카올리나이트만을 함유한 정제수(Milli-Q water)를 블랭크 샘플로 사용하였다. 혼합 샘플은 평형을 위해 72시간 동안 진탕기에 놓았다. 흡착 후 용액에서 광물 입자를 분리하기 위해, 상층액을 미리 세척한 셀룰로오스 아세테이트 필터(기공 크기:1.2 μm)로 걸렀다. 카올리나이트의 휴믹물질 흡착량은 초기 휴믹물질과 흡착 후 잔류 휴믹물질 사이의 용존유기탄소(DOC) 백분율 차이를 이용해 계산하였다.

[0088] **2. 결과**

[0089] **2.1. 휴믹물질 소수성 분포(극성 크기) 측정을 위한 이동상 선택 및 표준 검정 곡선 산출**

[0090] **2.1.1. 최적의 분해능을 위한 이동상의 선택**

[0091] HILIC은 극성에 따라 용액에서 다양한 유기 화학 물질을 분리하므로 HILIC 크로마토그램은 비균질적 특성을 가진 휴믹물질의 소수성(극성 정도)에 대한 연속 분포를 제공할 수 있다. HILIC의 이동상에서 유기 용매의 비율이 높을수록 극성 분석 물질의 머무름시간이 길어지는 사실을 기초로, 본 발명에서는 HILIC의 최상의 분리 성능을 달성하기 위해 이동상에 대한 여러 조건을 테스트했다. 아세토니트릴 메탄올을 각각 물과 다양한 부피 비율로 혼합하였다(아세토나이트릴 또는 메탄올: 물, 50:50, 60:40, 70:30, 및 80:20). 분해능 테스트는 휴믹물질 모델이며, log Kow 값이 각각 1.87과 2.30인 벤조산과 살리실산을 사용하여 수행되었다. 최적의 분리도($R_S$)를 나타내는 최적의 이동상 용매 혼합 비율을 측정했으며, 이는 다음 식에 따라 계산되었다.

$$R_S = \frac{t_R(B) - t_R(A)}{\left[\frac{w(A) - w(B)}{2}\right]}$$

[0092]

[0093] (tR(B)는 살리실산의 머무름시간, tR(A)는 벤조산의 머무름시간, w(A)는 벤조산의 피크 폭, w(B)는 살리실산의 피크폭을 의미한다)

[0094] 이동상의 두 가지 다른 유기 용매 사이의 혼합 비율에 따른 분리도($R_S$) 값은 하기 표 3에 기재하였다.

표 3

[0095]

| | 50:50(v/v) | 60:40(v/v) | 70:30(v/v) | 80:20(v/v) |
|---|---|---|---|---|
| **메탄올:정제수** | 0.01 | 0.05 | 0.08 | 0.00 |
| **아세토나이트릴:정제수** | 0.27 | 0.30 | 0.38 | 0.15 |

[0096] 아세토나이트릴과 정제수의 비율이 70:30(v:v)인 이동상이  최상의 분리도(Rs)를 나타냈으며, 그 값은 0.38이었다. 용리액 pH는 최적 조건에서 3.9~4.3의 제한된 범위 내에 있었다. 이동상에서 아세토니트릴의 함량이 높거나 낮아도 분해능은 크게 개선되지 않았다. 한편, 이동상의 유기 용매로 메탄올을 사용하였을 때 아세토니트릴에 비해 훨씬 낮은 분해능이 나타났다($R_S$: 0.00-0.08).

[0098] **2.1.2. 7가지 대표 화합물 선정 및 HILIC 검정 곡선 산출**

[0099] 불균일 혼합물인 휴믹물질 샘플의 극성 측정에 이용되는 합리적이고 로버스트(robust)한 HILIC 검정 곡선을 얻

기 위해 8개 대표 화합물을 선택하였다. 대표화합물은 티민(Thymine), 갈산(Gallic acid), 페룰산(Ferulic acid), 벤조산(Benzoic Acid), 살리실산(Salicylic acid), 아세나프텐(Acenaphthene), 페난트렌(Phenanthrene) 및 파이렌(Pyrene)으로 이들은 휴믹물질 전구 화합물들이다.

[0100] 위 8개 대표화합물들의 HILIC 크로마토그램(이동상_아세토나이트릴: 정제수 = 70:30(v:v))에서의 머무름시간(RT)과 각 화합물들의 고유 옥탄올-물 분배계수(Log Kow)와의 관계를 나타내는 검정 곡선(calibration curve)을 얻었다(도 3).

[0101] 8개 대표 휴믹물질 전구체 화합물의 알려진 개별 고유한 Log Kow 값은 표 4에 나타냈다.

표 4

[0103]

| 화합물 | Log Kow | 화합물 | Log Kow |
|---|---|---|---|
| 티민 | 0.62 | 살리실산 | 2.3 |
| 갈산 | 0.70 | 아세나프텐 | 3.92 |
| 페룰산 | 1.51 | 페난트렌 | 4.5 |
| 벤조산 | 1.87 | 파이렌 | 4.9 |

[0104] 더 높은 Log Kow 값을 가진 전구체 화합물은 더 낮은 Log Kow 값을 가진 화합물에 비해 컬럼과의 상호 작용 정도가 낮기 때문에 HILIC 시스템에서 짧은 머무름시간(RT)을 나타냈다. 위8개의 대표 화합물들을 사용하여 도출한 표준 검정 곡선은 머무름시간과 개별 Log Kow 값($R^2$ = 0.950) 사이에 도 3의 (b)와 같은 선형 상관 관계를 나타냈다.

[0105] 위에서 얻은 선형 상관 관계에서 Low Kow에 대한 식으로 다음과 같은 회귀 방정식을 얻었다.

[0106] $$\text{Log } K_{ow} = -2.83 \times (\text{RT}) + 17.44$$

[0107] 위 회귀방정식을 이용해 극성을 측정하고자 하는 대상 휴믹물질의 HILIC 크로마토그램에서 머무름시간 값을 Log Kow 값으로 변환하였다. 이를 통해 RT에 대한 연속분포인 크로마토그램을 Kow에 대한 연속분포인 HILIC 크로마토그램으로 변환하였다.

[0109] **2.2. 검정대상 휴믹물질의 극성 지표(평균 Log Kow) 측정 및 타당성 검증**

[0110] **2.2.1. 대표 휴믹물질 시료의 평균 Log Kow 값과 기존 극성 지표인 (N+O)/C 비교**

[0111] 7개의 대표 휴믹물질 시료의 HILIC 크로마토그램을 비교했다(도 4의 a). 측정된 모든 크로마토그램은 넓고 비스듬한 단봉 분포를 가졌다. 각 휴믹물질 성분의 크로마토그램에서 가장 높은 피크에 해당하는 Low Kow 값은 ESHA> PPHA> SRHA > SRFA > SRNOM > ESFA > MRNOM 순으로 높게 나타났다. 그러나 가장 높은 피크와 일치하는 단일 Low Kow 값은 불균일 혼합물인 휴믹물질의 전체 Low Kow 값 분포를 반영할 수 없다. 따라서, 휴믹물질의 Log Kow 값의 전체 분포를 대표하는 Log Kow 값을 구하기 위해 평균 Log Kow 값의 개념을 도출하였다. 여기서 평균 log Kow 값은 다음 식에 따라 계산될 수 있다.

[0112] $$\text{평균 Log Kow} = \sum_{i=0}^{N}(x_i \times h_i) \Big/ \sum_{i=0}^{N} h_i$$

[0113] 식 중, $x_i$는 머무름시간을 Low Kow으로 변환한 휴믹물질 크로마토그램의 Log Kow 값, $h_i$는 Log Kow 값에 해당하는 흡광도 값이다.

[0114] 위에서 얻은 극성 지표인 평균 Log Kow의 타당성을 검증하기 위해 IHSS에서 제공하는 원소분석 기반의 기존 극성 지표인 (N + O)/C 과의 상관 관계를 비교했으며, 평균 Log Kow 값은 기존의 원소 조성(R2 = 0.9392, p = 0.0003)에 따른 극성 지표와 강한 관계를 나타냄을 확인했다(도 4의 b, 표 5). 즉, HILIC 크로마토그램을 이용한 평균 Log Kow 값이 휴믹물질의 극성을 설명하는 간단한 지표로 사용될 수 있음을 의미한다. 또한, 평균 Log

Kow 값은 특정 유기 화합물의 각각의 Log Kow 값과 비교할 수 있기 때문에 휴믹물질의 소수성 또는 극성의 표준화되고 직관적인 측도로 이용할 수 있으므로, 평균 Log Kow는 전통적인 극성 지표인 (N + O)/C에 비해 휴믹물질의 극성 또는 소수성 관련 환경 거동을 예측하기 용이한 지표이다.

표 5

[0115]

| 휴믹샘플 | 평균 log Kow | (O + N)/C |
|---|---|---|
| SRHA | 3.11 ± 0.06 | 0.76 |
| ESHA | 3.30 ± 0.01 | 0.63 |
| PPHA | 3.13 ± 0.03 | 0.73 |
| SRFA | 2.96 ± 0.01 | 0.83 |
| ESFA | 2.92 ± 0.05 | 0.81 |
| SRNOM | 2.95 ± 0.03 | 0.84 |
| MRNOM | 2.91 ± 0.08 | 0.88 |

[0116] **2.2.2. 휴믹물질의 새로운 극성 지표로서 평균 Log Kow값의 타당성 검증**

[0117] 도 5와 같이 각각 강물과 방류된 폐수에서 분리된 두 개의 휴믹물질의 HILIC 크로마토그램을 비교하였다. 위에서 얻은 검정곡선(도 3의 b 참조)을 이용해 HILIC 크로마토그램의 머무름시간을 Log Kow값으로 환산하였다. 강물 휴믹물질(도 5의 a)은 Low Kow =2.53, 폐수 휴믹물질(도 5의 b)은 Low Kow =2.21 값에서 하나의 날카로운 피크값(최대 흡광도)을 동반하는 넓은 피크 형태의 크로마토그램을 보였다(도 5).

[0118] 강물 휴믹물질의 평균 Log Kow 값은 폐수 휴믹물질보다 높게 계산되었으며(강물 휴믹물질 평균 Log Kow=2.94 ± 0.13, 폐수 방류수 휴믹물질 평균 Log Kow=2.73 ± 0.11), 강물 휴믹물질이 폐수 휴믹물질보다 극성이 작다는 것을 나타낸다(=강물 휴믹물질의 소수성이 큼). 이러한 결과는 방류된 폐수 휴믹물질이 강물 휴믹물질에 비해 생분해성이 더 큰 친수성 특성을 가지고 있다는 기존 보고와도 일치했다(Yoo, J., Hur, J., Jung, J., 2019. Identification of oxidative stress and estrogenic activity induced by polarity fractions of effluent organic matter. J. Hazard. Mater. 375, 264-272.). 즉, 평균 Log Kow는 새로운 극성지표로 활용 가능함을 보여준다.

[0120] **2.3. 평균 옥탄올-물 분배계수를 이용한 파이렌에 대한 휴믹물질 결합 친화도 예측**

[0121] 본 발명의 휴믹물질의 평균 옥탄올-물 분배계수의 극성 지표로서의 타당성/실용성을 평가하기 위해 휴믹물질의 평균 옥탄올-물 분배계수와 파이렌 결합 계수(즉, Koc 값)와의 상관관계를 알아보았다. 이를 위해 IHSS에서 구입한 7개의 대표 휴믹물질 시료와 실시예 2.2.2에서 분리된 강물과 폐수 휴믹물질들의 평균 옥탄올-물 분배계수를 활용하였다.

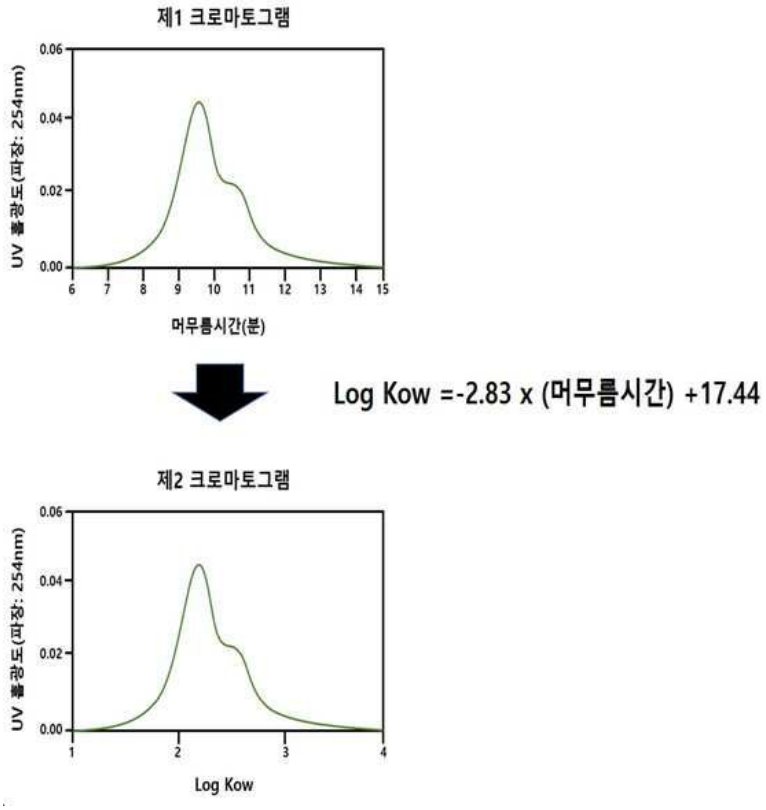
[0122] 그 결과 평균 옥탄올-물 분배계수는 파이렌 결합계수와 높은 상관계수를 보여 Koc 값을 예측하는 가장 좋은 능력을 보임을 확인하였다($R^2$ = 0.957; p < 0.0001). 파이렌 결합 친화도에 대한 설명자로서 평균 옥탄올-물 분배계수의 우수성은, 평균 옥탄올-물 분배계수가 소수성과 관련된 휴믹물질 환경 반응성에 대한 훌륭한 지표가 될 수 있음을 의미한다.

[0124] **2.4. 평균 옥탄올-물 분배계수와 카올리나이트의 휴믹물질 흡착량의 상관관계**

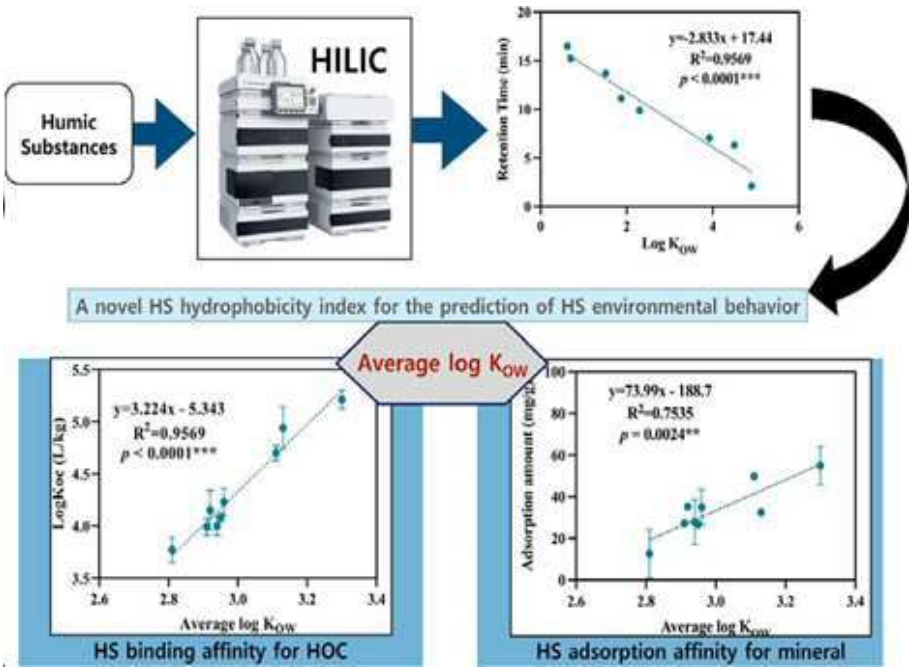
[0125] 중성 pH 범위에서 휴믹물질의 카올리나이트에 대한 흡착의 주요 원인은 소수성 상호작용이다. 주어진 실험 설정에서, 테스트된 모든 휴믹물질의 흡착 백분율은 40.0%에서 85.0% 사이의 범위에 속했다. 평균 옥탄올-물 분배계수(평균 Log Kow)가 가장 높은 ESHA에서 가장 높은 흡착 비율이 관찰되었으며, 평균 Low Kow 값이 가장 낮은 폐수 휴믹물질에서 가장 낮은 흡착이 발견되었다. 즉, 평균 Low Kow 값이 클수록 소수성이 컸으며, 소수성 지표인 옥탄올-물 분배계수의 특성이 유지됨을 보여주었다. 또한, 평균 옥탄올-물 분배계수는 카올리나이트의 휴믹물질 흡착과 유의한 관계를 나타냈으며($R^2$ = 0.630, p = 0.023), 이는 평균 옥탄올-물 분배계수가 휴믹물질의 흡착 거동을 설명하는 우수한 지표로서 이용될 수 있음을 의미한다.

## 도면

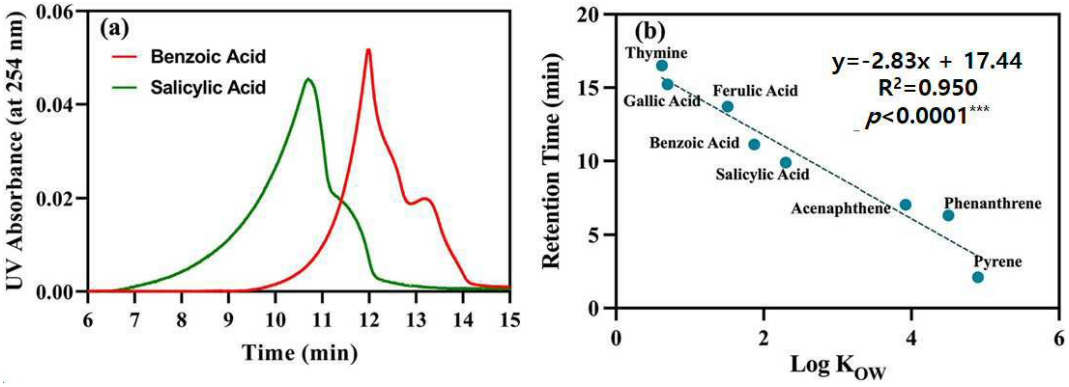
### 도면1


제1 크로마토그램
UV 흡광도(파장: 254nm)
머무름시간(분)
Log Kow =-2.83 x (머무름시간) +17.44
제2 크로마토그램
UV 흡광도(파장: 254nm)
Log Kow

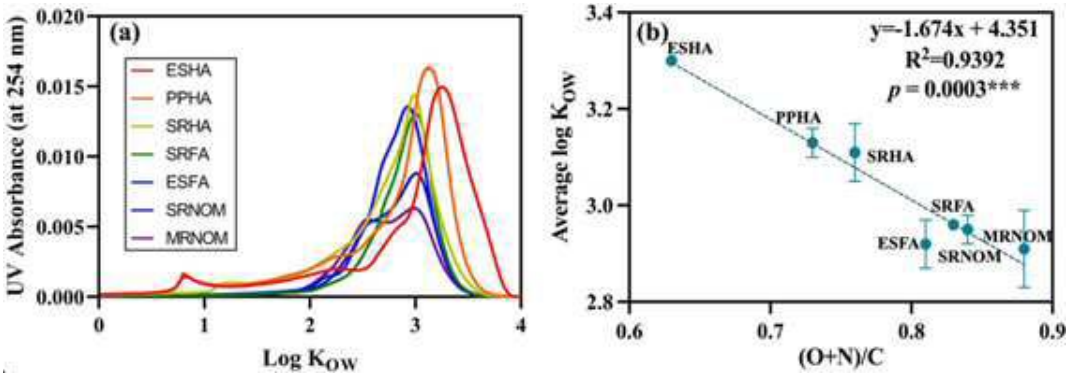
### 도면2


Humic Substances
HILIC
Retention Time (min)
Log K_OW
y=-2.833x + 17.44
R²=0.9569
p < 0.0001***
A novel HS hydrophobicity index for the prediction of HS environmental behavior
Average log K_OW
LogKoc (L/kg)
y=3.224x - 5.343
R²=0.9569
p < 0.0001***
Average log K_OW
HS binding affinity for HOC
Adsorption amount (mg/g)
y=73.99x - 188.7
R²=0.7535
p = 0.0024**
Average log K_OW
HS adsorption affinity for mineral

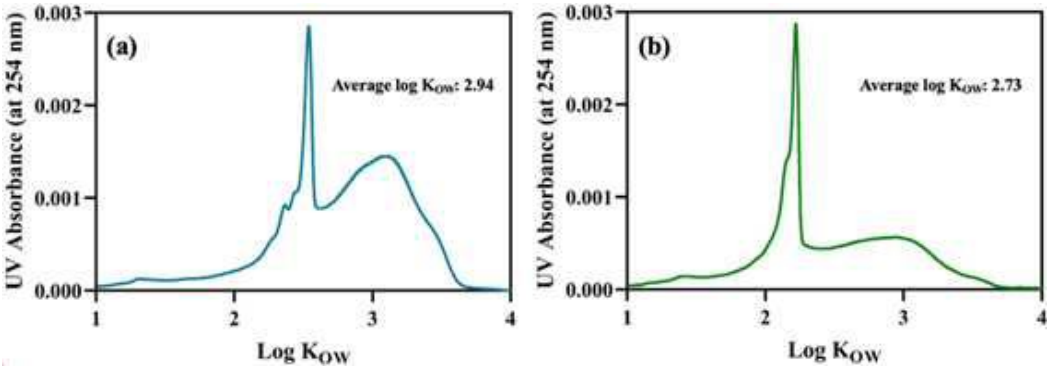
도면3


(a)
Benzoic Acid
Salicylic Acid
UV Absorbance (at 254 nm)
Time (min)
(b)
Thymine
Gallic Acid
Ferulic Acid
Benzoic Acid
Salicylic Acid
Acenaphthene
Phenanthrene
Pyrene
y=-2.83x + 17.44
R²=0.950
p<0.0001***
Retention Time (min)
Log K_OW

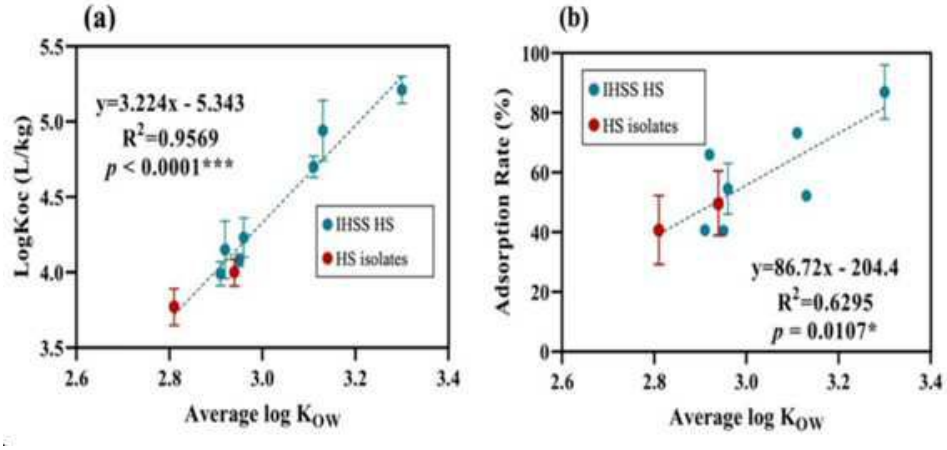
도면4


(a)
ESHA
PPHA
SRHA
SRFA
ESFA
SRNOM
MRNOM
UV Absorbance (at 254 nm)
Log K_OW
(b)
y=-1.674x + 4.351
R²=0.9392
p = 0.0003***
ESHA
PPHA
SRHA
SRFA
ESFA
SRNOM
MRNOM
Average log K_OW
(O+N)/C

도면5


(a)
Average log K_OW: 2.94
UV Absorbance (at 254 nm)
Log K_OW
(b)
Average log K_OW: 2.73
UV Absorbance (at 254 nm)
Log K_OW

도면6


(a)
y=3.224x - 5.343
R²=0.9569
p < 0.0001***
IHSS HS
HS isolates
LogKoc (L/kg)
Average log K_OW
(b)
IHSS HS
HS isolates
y=86.72x - 204.4
R²=0.6295
p = 0.0107*
Adsorption Rate (%)
Average log K_OW