



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0076236
(43) 공개일자 2017년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 27/62 (2006.01) C07H 3/02 (2006.01)
H01J 49/26 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 27/62 (2013.01)
C07H 3/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0186263
(22) 출원일자 2015년12월24일
심사청구일자 2015년12월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
김준곤
서울특별시 서초구 사임당로 130, 7동 806호 (서
초동, 신동아아파트)
이현희
서울특별시 성북구 지봉로24길 6-14 305호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 11 항

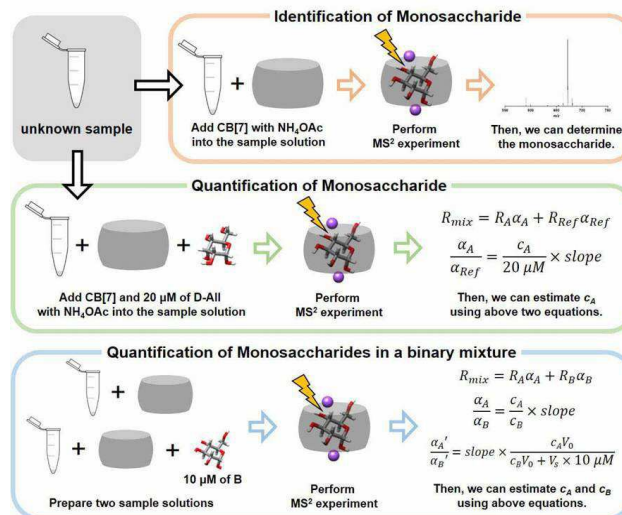
(54) 발명의 명칭 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법

(57) 요약

본 발명은 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것으로, 전자분무이온화 방법을 이용하여 기체상 주인-손님 상호작용에 따른 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성한 후, 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 통해 각 복합체 이온의 조개집 패턴을 확인하여 기체상에서 단당류를 정성 및 정량 분석하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 단당류들을 쉽고 빠르게 구별할 수 있을 뿐만 아니라 단당류의 상대 정량 및 절대 정량을 가능하게 하는 효과가 있어 단당류의 분석 시간 및 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

H01J 49/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HT13C-0011-040013

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 대구경부첨단의료산업진흥재단

연구사업명 첨단의료복합단지 기반기술구축

연구과제명 세척 후 잔류 세포독성 항암제의 정성정량분석기법개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.09.23 ~ 2016.09.22

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 단당류 수용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하는 단계;
- (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성하는 단계; 및
- (c) 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 이용하여 정성 및 정량 분석하는 단계;를 포함하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단당류는 갈락토오스(Galactose, Gal), 글루코오스(Glucose, Glc), 프럭토오스(Fructose, Fru), 만노오스(Mannose, Man), 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal), 사이코오스(Psicose, Psi), 소르보오스(Sorbose, Sor), 타카토오스(Tagatose, Tag), 이도오스(Idose, Ido)으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암모늄염은 아세트산암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계의 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 형성은 상기 혼합물의 전자분무이온화에 의한 쿠커비투릴[7]과 단당류의 기체상 주인-손님 상호작용에 의해 형성되는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 분석방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 단당류 수용액, 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염의 농도비는 1:1.5:3 내지 1:6:12인 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단당류의 정성 및 정량 분석은 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온으로부터 생성된 조각 이온(fragment ion)들의 질량/전하(m/z)의 비에 따른 이온량 비율을 분석하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단당류의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 분석대상 단당류와 내부표준물질로 선정된 단당

류가 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 단당류의 정량 분석은 내부표준법(internal standard method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석하는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 내부표준물질로 선정된 단당류는 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 단당류의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 서로 다른 복수의 분석대상 단당류가 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 단당류의 정량 분석은 표준 첨가법(standard addition method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석하는 것을 특징으로 하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법에 관한 것으로 상세하게는 전자분무이온화 방법을 이용하여 암모니아 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성한 후, 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 통해 기체상 주인-손님 상호작용에 따른 각 복합체 이온의 쪼개짐 패턴을 확인하여 기체상에서 단당류를 정성 및 정량 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이성체 생체분자들의 정성 및 정량 분석법 개발은 화학, 생물학 등의 다양한 분야에 있어서 중요한 과제이다. 다양한 이성체 생체분자들 중, 단당류는 체내 어디에서나 관찰되는 가장 흔한 이성체 생체분자로서 여러 가지 생물학적 과정과 질환에 관여한다. 주목할 점은 단당류의 농도 조절 오류가 암, 당뇨병과 같은 다양한 질병과 관련이 있다는 것이다(Johnson et al, *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 899; Pitknen, E. *Clin. Chim. Acta* **1996**, *251*, 91).

[0003] 하지만, 단당류들은 동일한 질량과 매우 유사한 구조로 인해 정성 및 정량 분석이 어렵다는 문제가 있다. 가장 널리 이용되고 있는 당류 분석 방법은 효소와 당류들 간의 산화-환원 반응을 이용한 방법이다(Wang, J. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 814). 하지만 이 방법의 경우, 높은 정확도와 정밀도를 얻기 위해서 효소가 담긴 용액의 수소 이온농도지수나 온도가 항상 적정 범위 내에 있도록 조절해 주어야 한다는 단점이 있다.

[0004] 또한, 핵자기공명(nuclear magnetic resonance) 장치의 경우 단당류들이 각각 존재할 경우 구별이 쉽지만, 이 단당류들이 혼합물 상태로 존재할 경우 혼합된 단당류들의 각각의 스펙트럼선들이 중첩되어 각 선들의 폭이 증가되어 단당류 혼합물들의 정성 및 정량 분석이 어렵다는 문제가 있으며, 액체 크로마토그래피(liquid chromatography)와 가스 크로마토그래피(gas chromatography)의 경우 단당류를 분석할 때 높은 감도를 가지기 위해서는 각각 컬럼의 유도체화(derivatization)와 단당류들의 유도체화를 수행해야 하기 때문에 많은 시료 준비단계가 필요하다는 단점이 있다.

[0005] 이에 최근에는 높은 감도와 적은 시료 소모량, 그리고 빠른 분석 속도를 위하여 질량 분석법(Mass Spectrometry, MS)을 이용하여 당류를 분석하는 방법들이 연구되고 있지만, 당류의 유도체화를 요구하거나 (Gaucher S. P. et al. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3009) 혹은 에너지-분해 MS(ERMS)와 같은 다수의 실험들이 추가로 필요하다는 단점이 있다(Madhusudanan, K. P. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 1096). 이에 따라, 단당류의 정성 및 정량 분석을 위한 신속하고 편리한 방법의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명은 전자분무이온화 방법을 이용하여 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성한 후, 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 통해 각 복합체 이온의 조개짐 패턴을 확인하여 단당류를 정성 및 정량 분석하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0008] (a) 단당류 수용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하는 단계; (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 이용하여 정성 및 정량 분석하는 단계;를 포함하는 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명의 일 실시 예에 따르면 상기 단당류 수용액에 포함된 단당류는 갈락토오스(Galactose, Gal), 글루코오스(Glucose, Glc), 프럭토오스(Fructose, Fru), 만노오스(Mannose, Man), 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal), 사이코오스(Psicose, Psi), 소르보오스(Sorbose, Sor), 타카토오스(Tagatose, Tag), 이도오스(Idose, Ido)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 암모늄염은 아세트산암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 (b) 단계의 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 형성은 상기 혼합물의 전자분무이온화에 의한 쿠커비투릴[7]과 단당류의 기체상 주인-손님 상호작용에 의해 형성되는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 (a) 단계의 단당류 수용액, 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염의 농도비는 1:1.5:3 내지 1:6:12일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 단당류의 정성 및 정량 분석은 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온으로부터 생성된 조각 이온(fragment ion)들의 질량/전하(m/z)의 비에 따른 이온량 비율을 분석하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 단당류의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 분석대상 단당류와 내부표준물질로 선정된 단당류가 혼합되어 있는 것일 수 있다.
- [0015] 이때, 상기 단당류의 정량 분석은 내부표준법(internal standard method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석할 수 있다.
- [0016] 또한, 상기 내부표준물질로 선정된 단당류는 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 일 실시 예에 따르면, 상기 단당류의 정량 분석 시 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 서로 다른 복수의 분석대상 단당류가 혼합되어 있는 것일 수 있다.
- [0018] 이때, 상기 단당류의 정량 분석은 표준 첨가법(standard addition method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 쿠커비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법을 이용하면, 단당류들을 쉽고 빠르게 구별할 수 있을 뿐만 아니라 단당류의 상대 정량 및 절대 정량을 가능하게 하는 효과가 있어 단당류의 분석 시간 및 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 단당류의 정성 및 정량 분석방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 2는 수용액상에서 쿠커비투릴[7]과 단당류 간의 등은 적정 열량 측정계(Isothermal calorimetry, ITC) 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 단당류 20 μ M, 쿠커비투릴[7] 50 μ M 및 아세트산암모늄 100 μ M을 함유한 용액의 MS 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 4는 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 MS² 스펙트럼 및 정규화된 충돌에너지(Normalized collision energy, CE_{Norm})에 따른 조각 이온들의 이온량 비율을 나타낸 도면이다.

도 5는 알칼리 금속(리튬, 나트륨, 칼륨) 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 MS² 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 6은 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 Synapt G2 HDMS Q-TOF(a)와 Q-EXACTIVE Orbitrap(b) 질량분석기로 측정하여 얻은 MS² 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 7은 양성자화된 단당류 이온(a), 암모늄 이온이 결합된 단당류 이온(b)을 LTQ Velos 이온 트랩 질량 분석기로 측정하여 얻은 MS² 스펙트럼을 나타낸 도면이다.

도 8은 내부표준법을 이용하여 도출한 단당류별 검정곡선(a)과 표준첨가법을 이용하여 도출한 단당류 이원혼합물의 검정곡선(b)를 나타낸 도면이다.

도 9는 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 구조와 이온 이동성 스펙트럼 분포를 나타낸 도면이다.

도 10은 쿠커비투릴[7]의 공동 안에서 α 형 및 β 형 단당류의 C6에 결합된 히드록시기(-OH)의 기하학적 구조를 나타낸 도면이다.

도 11은 쿠커비투릴[7]의 공동 안에서 α 형 및 β 형 단당류의 C1(a), C2(b), C3(c), C4(d)에 결합된 히드록시기(-OH)의 기하학적 구조를 나타낸 도면이다.

도 12는 쿠커비투릴[7]의 공동 안에서 α 형 Glc와 Man의 C2에 결합된 히드록시기가 유사하게 배치되어 있을 경우의 C1, C2, C3, C4, C6에 결합된 히드록시기(-OH)의 기하학적 구조를 나타낸 도면이다.

도 13은 내부표준물질로 사용한 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal)을 사용하여 형성된 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온의 MS² 스펙트럼 및 정규화된 충돌에너지(Normalized collision energy, CE_{Norm})에 따른 조각 이온들의 이온량 비율을 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0022] 진술한 바와 같이, 단당류들은 동일한 질량과 매우 유사한 구조로 인해 정성 및 정량 분석이 어렵다는 문제가 있으며, 종래 단당류의 정성 및 정량 분석 기술들은 단당류들의 유도체화 혹은 에너지-분해 MS(ERMS)와 같은 다수의 실험이 추가적으로 요구되는 단점이 있었으며, 단당류의 혼합물들의 분석을 위해 추가로 컬럼 혹은 단당류들의 유도체화가 필요하다는 단점이 있다.

[0023] 이에, 본 발명에서는 쿠커비투릴[7]과 단당류의 기체상 주인-손님 상호작용에 따라 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성시킨 후, 이중질량분석법(Tandem Mass Spectrometry, MS²)을 이용하여 단당류들을 쉽고 빠르게 정성 분석할 수 있을 뿐만 아니라, 단당류의 상대 정량 및 절대 정량이 가능한 효과적인

단당류의 정성 및 정량 분석 방법을 제공하고자 한다.

- [0024] 도 1은 본 발명에 따른 단당류의 정성 및 정량 분석방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.
- [0025] 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 단당류의 정성 및 정량 분석방법은 (a) 단당류 수용액에 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염을 혼합하는 단계; (b) 상기 혼합물을 전자분무이온화(electrospray ionization) 방법으로 이온화시켜 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 형성하는 단계; 및 (c) 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온을 이중질량분석법(Tandem mass spectrometry)을 이용하여 정성 및 정량 분석하는 단계;를 포함한다.
- [0026] 이때, 상기 단당류는 당업계에 공지된 단당류라면 특별히 한정되지 않으나 바람직하게는 갈락토오스(Galactose, Gal), 글루코오스(Glucose, Glc), 프럭토오스(Fructose, Fru), 만노오스(Mannose, Man), 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal), 사이코오스(Psicose, Psi), 소르보오스(Sorbose, Sor), 타카토오스(Tagatose, Tag), 이도오스(Idose, Ido)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 암모늄염은 암모늄 이온을 포함하는 염이라면 이에 제한되는 것은 아니지만, 바람직하게는 아세트산 암모늄, 염화암모늄, 탄산암모늄, 수산화암모늄으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 (b) 단계의 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온은 전자분무이온화에 의해 단당류 수용액에 포함된 용매가 증발하면서 쿠커비투릴과 단당류의 기체상 주인-손님 상호작용에 의해 두 개의 암모늄 이온, 쿠커비투릴[7] 및 단당류가 복합체 이온을 형성한다.
- [0029] 또한, 상기 (a) 단계의 단당류 수용액, 쿠커비투릴[7] 및 암모늄염의 농도비는 1:1.5:3 내지 1:6:12인 것이 바람직하다. 이때, 상기 농도비가 상기 하한치 미만이면 결합하지 않는 단당류가 많아 정량에 문제될 수 있고, 상기 상한치를 초과하면 단당류가 결합되지 않은 쿠커비투릴[7] 이온이 많아져 복합체 이온 측정에 문제가 될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명에 따른 단당류의 정성 및 정량 분석은 상기 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온으로부터 생성된 조각 이온(fragment ion)들의 질량/전하(m/z)의 비에 따른 이온량 비율을 분석하는 단계;를 통해 수행될 수 있다. 이때, 상기 단당류를 정성 분석할 시에는 단당류 별로 형성된 암모늄 이온이 결합된 쿠커비투릴[7]-단당류 복합체 이온들로부터 생성된 각각의 조각 이온(fragment ion)들의 질량/전하(m/z)의 비에 따른 이온량 비율을 비교하여 단당류를 구별하게 된다.
- [0031] 또한, 상기 단당류를 정량 분석할 시에는 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 분석대상 단당류와 내부표준물질로 선정된 단당류가 혼합되어 있으며, 하기 실시 예에서 설명하는 바와 같이 내부표준법(internal standard method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석대상 단당류를 정량화할 수 있다. 이때, 상기 내부표준물질로 선정된 단당류는 체내에 거의 존재하지 않으며, 절대량을 알고 있는 단당류로서 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만 알로오스(Allose, All), 알트로오스(Altrose, Alt), 굴로오스(Gulose, Gul), 탈로오스(Talose, Tal)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 분석대상 단당류가 혼합되어 있는 경우에는 각 단당류별로 정량화 할 수 있는데, 이때 상기 (a) 단계의 단당류 수용액은 서로 다른 복수의 분석대상 단당류가 혼합되어 있으며, 하기 실시 예에서 설명하는 바와 같이 표준 첨가법(standard addition method)을 통해 도출한 검정 곡선을 통해 분석대상 단당류를 각각 정량화할 수 있다.
- [0033] 이하에서는 바람직한 실시 예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시 예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0034] 재료
- [0035] D-형 단당류(D-Gal, D-Glc, D-Fru, D-Man, D-All, D-Alt, D-Tal), L-형 단당류(L-Gul), 쿠커비투릴[7], 아세트산암모늄, 아세트산리튬, 아세트산소듐, 아세트산포타슘은 시그말 알드리치(St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다. 용매로서 Avantor Performance Materials, Inc.(Center Vallet, PA, USA)에서 구입한 HPLC-등급 물을 사용하였으며, 단당류의 스톡 용액은 100 mM 이상 준비하였으며, 스톡 용액의 정확한 농도는 핵자기공명 분광법(nuclear magnetic resonance spectroscopy)을 이용하여 결정하였다.

[0036] 등온 적정 열량 측정계 (Isothermal calorimetry calorimetry, ITC) 측정

[0037] 모든 ITC 실험은 25 °C에서 VP-ITC 열량 측정계(Microcal, Northampton, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. ITC 셀 내의 0.4 mM의 CB[7] 용액을 10 mM의 단당류 수용액이 함유된 시린지로 적정하였다. 실험 전에 솔루션 용액을 탈기하였으며, 주사 수는 40 회였고, 주입량은 6 µL였다. 초기 평형 시간은 1000 s, 주입 간격은 300 s였다.

[0038] 이중질량분석법

[0039] 단당류 분석을 위한 이중질량분석(Tandem MS, MS²) 실험은 ESI 소스를 갖춘 Thermo Scientific LTQ Velos 이중 이온 트랩 질량 분광계(San Jose, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 분무 전압은 3.5 kV, 모세관의 온도는 300 °C, 차단 가스의 흐름(sheath gas flow)은 18(arbitrary units)이었다. CB[7]의 농도는 150 µM, 암모늄 염과 금속 염의 농도는 300 µM이었다. 각 단당류의 정량 분석을 위한 D-allose의 농도는 20 µM으로 조정하였다. 내부표준법에 의한 정량 시의 정규화된 충돌에너지(CE_{Norm}) 및 표준첨가법에 의한 정량 시의 정규화된 충돌에너지(CE_{Norm}) 값은 각각 15%와 18%로 설정하였다.

[0040] 고해상도 질량분석 실험은 Thermo Q-Exactive Orbitrap 질량 분석기로 수행하였다. 분무 전압은 4.00 kV, 모세관의 온도는 200 °C이었다. 이온 이동도 측정 실험은 Z-spray ESI 소스를 갖춘 Synapt G2 HDMS 질량 분석기(Waters, Manchester, U.K.)를 사용하였다. 모세관, 샘플링 콘, 추출 콘 전압은 각각 2.00 kV, 20 V, and 2.00 V 이었으며, 소스 및 탈용매 온도는 각각 100, 150 °C였다. 헬륨의 IMS 셀의 가스 흐름은 각각 180 mL/min 과 60 mL/min였으며, 전파 속도 및 높이는 각각 280 m/s, 13 V였다. 또한, 충돌 단면에 대한 도착 시간을 보정하기 위하여 폴리아닐린을 사용하였다.

[0041] 분자 역학(Molecular Dynamics, MD) 시뮬레이션 및 밀도함수이론(Density Functional Theory, DFT) 계산

[0042] 모든 MD 시뮬레이션은 Gromacs 4.5.5.(Hess, B. et al. *J. Chem. Theory Comput.* **2008**, 4, 435)을 사용하여 측정하였다. CB[7]과 단당류들의 힘 필드 파라미터(force field parameter)는 CHARMM general force field (CGENFF)으로부터 적용시켰다(Vanommeslaeghe, K. et al. *J. Comput. Chem.* **2010**, 31, 671).

[0043] CB[7]-단당류 복합체 이온들의 초기 기하학적 구조는, CB[7]의 공동 안으로 단당류들을 삽입하기 위하여 Hyperchem 7.5 (Hypercube Inc., Gainesville, FL, USA)를 사용하여 형성하였으며, 가스 상에서 후보 구조를 획득하기 위하여 시뮬레이티드 어닐링을 수행하였다. 300 어닐링 사이클(90 ns)의 마지막 프레임을 추출하고, 각 복합체 이온 중 다섯 개의 가장 낮은 에너지 구조들에 대한 추가적인 구조 최적화를 수행하였다. 구조의 최적화는 DFT calculations과 Q-Chem4.1 computational package (Q-Chem Inc., Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 수행하였다. 이어서, CB[7]의 공동 내부의 단당류 간의 구조적 차이를 관찰하기 위하여 최 α 적화된 복합체들에 대하여 600 °C에서 등온 어닐링을 실시하였다.

[0044] 단당류 혼합물에서, MS² 스펙트럼을 통한 단당류의 정량 분석

[0045] 먼저, MS² 스펙트럼에서 조각 피크들의 신호를 통합하고, 두 조각(fragment) 피크들(*m/z* 662.8 and 671.8) 사이의 상대적인 존재 비(abundance ratio)를 획득하였다. Man과 Fru가 혼합된 단당류 혼합 수용액의 경우 *m/z* 653.8 과 671.8을 정량에 사용하였는데, 이는 Man과 Fru의 *m/z* 662.8 per 671.8의 존재비가 유사하기 때문이다. 조각 피크들의 신호는 5 σ로 통합하였다. 이후, 하기 식 (1)과 하기 표 1을 사용하여 두 단당류들의 α 값을 계산하였다.

[0046] [식 1]

[0047]
$$R_{mix} = R_A \alpha_A + R_{Ref} \alpha_{Ref} = R_A \alpha_A + R_{Ref} (1 - \alpha_A)$$

표 1

[0048]

<i>m/z</i>	590.7	599.2	653.8	662.8	671.8	680.8
All	0.09	0.02	0.07	0.08	0.73	0.01
Gal	0.01	0.01	0.01	0.01	0.71	0.25
Glc	0.10	0.04	0.01	0.44	0.36	0.05
Man	0.15	0.17	0.01	0.17	0.49	0.01
Fru	0.14	0.15	0.52	0.05	0.13	0.01

[0049] 검정 곡선의 기울기를 이용한 단당류의 정량 분석

[0050] 분석 대상 단당류의 농도는 하기 [식 2]를 이용하여 계산하였으며, 용액 상에서 기준 단당류의 농도를(c_{Ref}) 정량하기 위해, 분석대상 단당류와 기준 단당류의 a 값의 비율($y = a_A / a_{\text{Ref}}$)과 두 단당류의 검정 곡선의 기울기를 이용하였다.

[0051] [식 2]

[0052]
$$\frac{a_A}{a_{\text{Ref}}} = y = m \times \frac{c_A}{c_{\text{Ref}}}, c_A = \frac{y}{m} \times c_{\text{Ref}}$$

[0053] 또한, 단당류 이원혼합물에서의 두 단당류(A와 B로 표시)를 정량하기 위해, 표준첨가법(Standard addition method)을 기반으로 하기의 [식 3]과 [식 4]를 이용하였다.

[0054] [식 3]

[0055]
$$\begin{cases} \frac{a_A}{a_B} = y = m \times \frac{c_A}{c_B} \\ \frac{a_A'}{a_B'} = y' = m \times \frac{c_A V_0}{c_B V_0 + c_{B,s} V_s} \end{cases}$$

[0056] [식 4]

[0057]
$$c_A = \frac{c_{B,s} V_s}{m V_0} \times \frac{y y'}{y - y'}, c_B = \frac{m c_A}{y}$$

[0058] 이때, 상기 추가로 첨가되는 단당류 B의 농도($c_{B,s}$)는 10 μM 으로 조정하였다.

[0059] 고찰

[0060] 합성 고분자를 이용하는 주인-손님 화학은 때때로 이성체 분자를 구별하기도 하지만(Han, C. et al. *Sens. Actuator B-Chem.* **2009**, 137, 704), 단당류 이성체 구별은 주인-손님 화학에서도 여전히 해결할 과제이다. 그 이유는 단당류와 물 분자 간의 수소 결합이 합성 고분자와 단당류가 결합을 할 경우 끊어지게 되어 에너지적 불이익을 갖게 하기 때문이다. 또한 이러한 강한 비-공유 결합이 존재하는 수용액 상에서는 단당류들 간의 미세한 구조적 차이가 잘 보이지 않을 수 있기 때문이다. 따라서 본 발명에서는 물이 없는 상태에서 단당류 이성체들이 합성 고분자와 결합이 가능할 것이라는 점과 단당류 이성체들 간의 구조적 차이가 기체상에서 합성 고분자인 CB[7]과의 주인-손님 상호작용을 통해 쉽게 표출될 것이라는 점에 착안하여 본 발명을 완성하였다.

[0061] 본 발명의 분석대상이 되는 단당류들은 반드시 이에 제한되는 것은 아니지만, 인체 내에서 가장 흔한 단당류 이성체로서 D-갈락토오스(Gal), D-글루코오스(Glc), D-만노오스(Man)와 D-프룩토오스(Fru)를 사용하였으며, 먼저 수용액에서 이들과 CB[7]과의 상호작용을 등은 적정 열량 측정계(ITC)를 이용한 열 측정을 통해 조사하였다. 그 결과, 상기 단당류 중 어느 것도 수용액에서 CB[7]과 유의한 상호작용을 나타내지 않았음을 확인하였는바(도 2), 이는 아마도 이들 단당류들이 친수성을 가지며 양이온성 작용기가 없기 때문으로 보여진다(Lee, J. W. et al. *J. Phys. Chem. B* **2013**, 117, 8855).

[0062] 이와는 달리 본 발명에서는 전자분무이온화(ESI)를 통해 CB[7]과 단당류 복합체가 형성됨을 확인할 수 있는데(도 3), 이는 ESI 중에 물과 단당류 사이의 상호작용이 제거되고 정전기적 상호작용이 강해져 주인-손님 결합이 증대될 수 있기 때문이다. CB[7]-단당류 복합체는 용액에 첨가되는 염의 유형에 따라 암모늄 이온 또는 알칼리 금속이온과의 양이온화된 형태로서 관찰되었는데, MS^2 를 수행하여 암모늄 이온 또는 알칼리금속 이온과의 CB[7]-단당류 착물의 쪼개짐 패턴을 조사한 결과(도 4, 도 5), 알칼리 금속이 결합된 복합체는 충돌 활성화시 CB[7]로부터 단당류가 쉽게 분리됨을 보이는 반면에, 서로 다른 단당류의 암모늄 염이 결합된 CB[7]-단당류 복합체 이온은 도 4에 나타난 바와 같이 이온 트랩 MS(LTQ Velos)에서 광범위한 MS^2 파라미터에 걸쳐 뚜렷이 구별되는 쪼개짐 패턴을 나타냄을 확인할 수 있었다. 암모늄 염이 결합한 CB[7]-단당류 복합체 이온의 조각 피크는 주로 암모니아와 물이 빠진 복합체 이온에 부합하는 m/z 680.8, 671.8, 662.8, 653.8, 599.2와 590.7에서 관찰되었다

(도 4, 도 6). 대조적으로 CB[7]이 없는 순수한 단당류 이온은 서로 다른 단당류들을 구별하기 어려운 쪼개짐 패턴들을 보여주었다. Gal, Glc와 Man의 양성자화 된 형태들은 매우 비슷한 쪼개짐 패턴을 보였고 암모늄 염과 결합된 Gal과 Man은 공통적으로 비슷한 쪼개짐 패턴을 가졌다(도 7). 이들 결과를 통해 본 발명에 사용된 CB[7]이 기체상에서 단당류 구조의 작은 차이를 증폭하여 뚜렷이 구별되는 쪼개짐 패턴을 수득하고 MS²를 통한 정성 분석을 용이하게 하였음을 알 수 있었다. 또한, 이러한 CB[7]-단당류 복합체 이온의 뚜렷이 구별되는 쪼개짐 패턴은 서로 다른 MS² 방식을 채용하는 서로 다른 3개의 질량 분석기(즉, 이온 트랩, orbitrap과 Q-TOF 질량 분석기)로 관찰하여 관찰의 보편성을 입증하였다(도 6).

[0063] 또한, 본 발명에서는 상술한 바와 같이 CB[7]을 이용하여 단당류를 정성적으로 구별할 수 있을 뿐만 아니라 단당류의 정량 분석을 가능하게 한다. 구체적으로, 암모늄 염이 결합된 CB[7]-단당류 복합체 이온의 혼합물의 쪼개짐 패턴은 복합체 이온 각각의 조각화 패턴의 선형 조합으로 분리될 수 있다. 그러나 이러한 선형 분리로부터 얻어진 각 단당류들의 복합체 이온의 비는 MS에서 관찰되는 용액에서의 결합성과 기체상에서의 결합성 모두에 의해 영향을 받기 때문에 용액에서의 단당류의 비와 반드시 일치하는 것은 아니라는 점에 주목해야 한다. 본 발명에 따른 ESI 중 결합 현상의 복잡성은 단당류가 용액에서 CB[7]과 거의 상호작용하지 않았기 때문에 크게 감소되었다. 이에 따라, 용액 중에 존재하는 단당류의 비와 기체상에서 복합체 이온으로 나타나는 단당류의 비 사이에서 단순한 관계를 찾을 수 있다. 본 발명에서는 천연 단당류에 비해 MS²에서 뚜렷이 구별되는 쪼개짐 패턴을 보인 비천연 단당류 표준으로서 D-알로오스(A11)를 내부표준물질로 사용하였으며, 이와 함께 단당류 이성체의 정량 분석을 위해 CB[7] 복합체의 뚜렷이 구별되는 쪼개짐 패턴을 활용하였다(도 13). 5개 단당류(4개는 분석대상이고 1개는 내부표준물질임)의 쪼개짐 피크의 상대 존재(relative abundance)는 상기 표 1에 나타난 바와 같다.

[0064] 한편, 정규화된 충돌 에너지(CE_{Norm.})의 15% 조건에서 완전한 조각화가 관찰되었기 때문에 이 조건을 MS² 실험 중에 이용하였다. 분석할 단당류와 내부표준물질인 단당류의 혼합물에서 MS² 스펙트럼에 있는 쪼개짐 피크의 상대 존재는 하기 식 1에 나타난 바와 같은 관계식을 따른다:

[0065] [식 1]

$$R_{mix} = R_A \alpha_A + R_{Ref} \alpha_{Ref} = R_A \alpha_A + R_{Ref} (1 - \alpha_A)$$

[0066] 상기 [식 1]에서 α_A 와 α_{Ref} 은 각각 복합체 이온으로서 존재하는 분석할 단당류와 내부표준물질(기준)로 선정된 단당류의 분율을 나타낸다. R_A , R_{Ref} 과 R_{mix} 는 각각 분석대상이 되는 단당류 복합체 이온, 내부표준물질로 선정된 단당류 복합체 이온과 단당류 복합체 이온의 혼합물의 MS² 스펙트럼에 있는 2개의 쪼개짐 피크의 상대 존재($R = I_A/I_B$)를 나타낸다. 본 연구에서 m/z 662.8과 671.8에서의 피크는 가장 재현성 있는 결과를 제공하였기 때문에 각각의 단당류를 정량화하기 위해 이들 피크를 선택하였다.

[0068] 본 발명에서는 상기 [식 1]을 이용하여 10-100 μ M 범위의 분석할 단당류를 정량화하기 위해서 단당류 착물의 기체상 분율 α_A 과 α_{Ref} 을 얻었다. α_A 과 α_{Ref} 의 비는 용액 중 분석대상 단당류와 내부표준물질로 선정된 단당류의 농도의 비에 비례하였음을 확인하였다. 도 8a는 용액 중 단당류의 비와 기체상에서 암모늄 이온과 결합된 CB[7]-단당류 복합체 이온의 단당류의 비 사이에 선형 관계가 있음을 보여주고 있다. Gal, Glc, Man과 Fru에 대한 검정 곡선의 기울기는 각각 0.489, 0.345, 0.631과 0.189로 높은 선형성($R^2=0.999$)을 보였다. 또한 4개 단당류의 검출 한계(LOD)와 정량 한계(LOQ)는 각각 0.46-0.90 g/mL와 1.39-2.72 g/mL로(표 2 참조), 본 발명에 따른 분석방법이 인체 내 소량의 단당류의 농도를 결정하기에 매우 적합한 방법임을 암시한다.

표 2

[0069]

	LOD (μ g/ml)	LOQ (μ g/ml)
Gal	0.62	1.88
Glc	0.46	1.39
Man	0.90	2.72
Fru	0.87	2.65

[0070] 본 발명에서는 2 성분 단당류 혼합용액에서의 단당류의 정량을 위해 혼합물 내 단당류 중 하나를 표준물질로서 분석대상 용액에 첨가하는 것을 포함하는 실험으로부터 분석대상의 농도를 추론하는 표준물질 첨가방법을 기반으로 MS² 실험을 수행하였다. 이때, MS²(LTQ Velos) 중 CE_{Norm.}을 18%로 설정하였으며, 먼저 각각의 천연 단당류와 알로오스(A11)로부터 얻은 관계(도 8a)와 유사한 2개 단당류의 비 사이의 관계(도 8b)를 얻었다. 다음, 혼합물 중 2개 단당류(A와 B로 표시)의 값을 상기 [식 3]을 이용하여 계산함으로써 상기 단당류의 농도 비를 얻었다. 이 방법을 이용하여 2개 단당류의 혼합물 농도를 하기 표 3과 4에 나타난 바와 같이 매우 정확하게 계산할 수 있었다.

표 3

[0071]

[Glc]:[^a M]	5 : 20			20 : 5		
^a M	Gal	Man	Fru	Gal	Man	Fru
[Glc]	5.1 0.1	5.3 0.6	5.1 0.1	19.7 1.9	19.7 0.2	21.0 0.3
[^a M]	18.8 0.4	21.4 1.9	22.2 0.8	4.7 0.4	5.9 0.7	4.9 0.7

[0072] ^aM indicates monosaccharides, Gal, Man, and Fru.

표 4

[0073]

[A]:[B]	5 : 20			20 : 5		
A	Gal	Gal	Man	Gal	Gal	Man
B	Man	Fru	Fru	Man	Fru	Fru
[A]	4.9 0.3	4.7 0.3	4.6 0.2	20.6 0.9	19.1 0.2	20.5 1.1
[B]	19.2 1.6	18.5 1.2	19.0 1.2	5.7 0.2	6.1 0.4	4.4 0.5

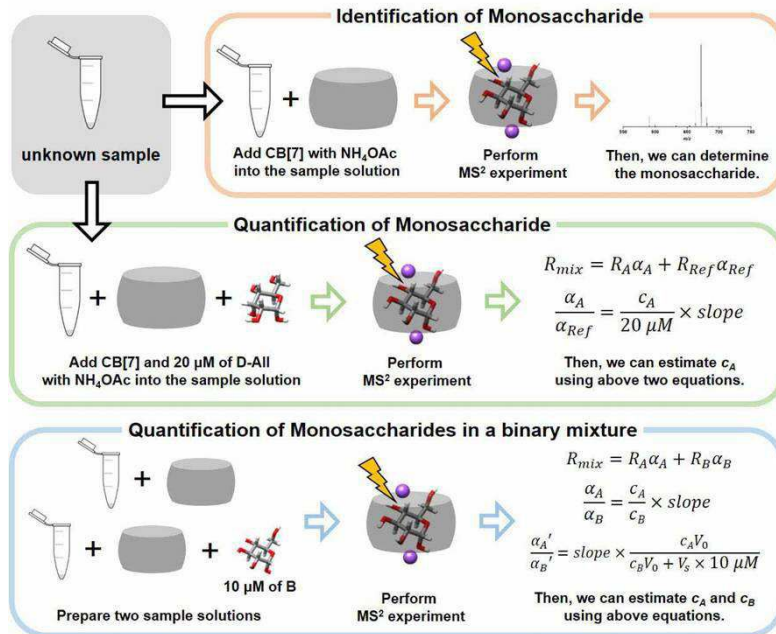
[0074] 한편, CB[7] 내부에서의 단당류의 서로 다른 주인-손님 상호작용을 이해하기 위해서 암모늄 이온이 결합된 CB[7]-단당류 복합체 이온의 구조적 특성을 기체상 이온의 전체 구조 정보를 제공할 수 있는 이온 이동도 MS(Synapt G2 HDMS)를 이용하여 분석하였다. 복합체 이온의 도달시간은 복합체를 형성하지 않은 암모늄 염이 결합된 CB[7] 이온의 도달시간과 거의 동일함을 확인하였으며, 이를 통해 단당류가 CB[7] 공동 안에 존재함을 확인하였다(도 9). 또한, 분자 역학(MD) 시뮬레이션과 밀도 함수 이론(DFT) 계산을 이용한 전산 모델링을 통해 상기 단당류가 진공에서 CB[7] 공동 내에 존재하고 있음을 확인하였다(도 9). 더 나아가 CB[7] 안에서 단당류 각각의 기하구조는 뚜렷이 구별되는바, 이는 서로 다른 단당류가 CB[7]과 서로 다르게 상호작용을 함을 추정할 수 있다.

[0075] 다음으로, 열적으로 활성화된 기체상에서의 CB[7] 내 단당류들의 기하구조를 관찰하기 위해 등은 어닐링 시뮬레이션을 600 K에서 150 ns 동안 수행하였다. 착물 이온의 기하구조들을 취합해본 결과, 단당류 각각이 CB[7] 공동 안에서 허용되는 서로 다른 위치에 존재함을 확인할 수 있었다. 당류 히드록실기와 CB[7]의 중심 면 사이의 거리와 각도는 하기 도 10과 도 11에 나타내었다. 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이 단당류의 C6에 결합되어 있는 히드록실기의 배향은 열적 활성화 조건에서도 상이하였으며, C2에 결합되어 있는 히드록실기를 제외한 다른 모든 히드록실기에 대해서도 동일한 경향을 보였다. α형 Glc와 Man의 C2에 결합되어 있는 히드록실기의 경우 서로 유사한 배향을 보였으나 도 12에서 볼 수 있듯이 C2에 결합되어 있는 히드록실기를 제외한 나머지 모든 히드록실기가 서로 다르게 배치되어 있어 CB[7] 내에서 α형 Glc와 Man 역시 다르게 존재함을 확인할 수 있었다.

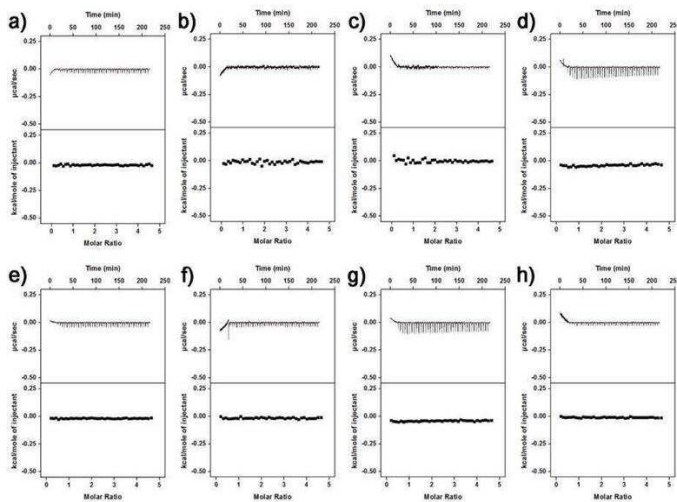
[0076] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 쿠키비투릴[7]을 이용한 단당류의 정성 및 정량 분석방법을 이용하면, 종래 기술의 문제점으로 지적되었던 유도체화와 같은 별도의 시료 처리 없이도 단당류들을 쉽고 빠르게 구별할 수 있을 뿐만 아니라 단당류의 상대 정량 및 절대 정량을 가능하게 하는 효과가 있어 단당류의 분석 시간 및 비용을 획기적으로 감소시킬 수 있다.

도면

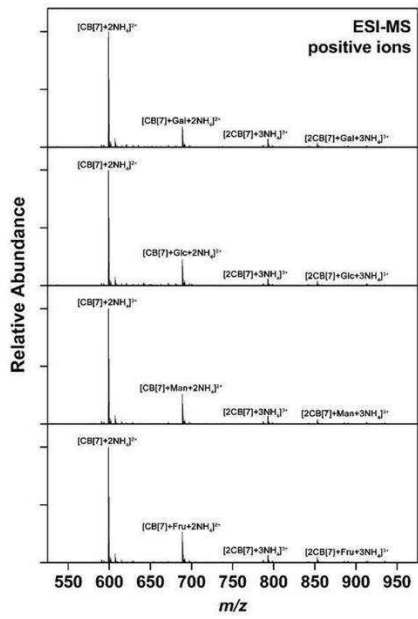
도면1



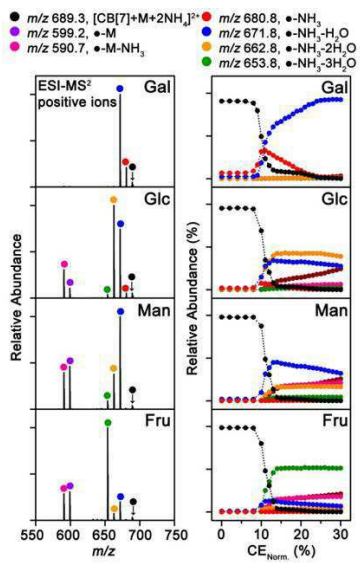
도면2



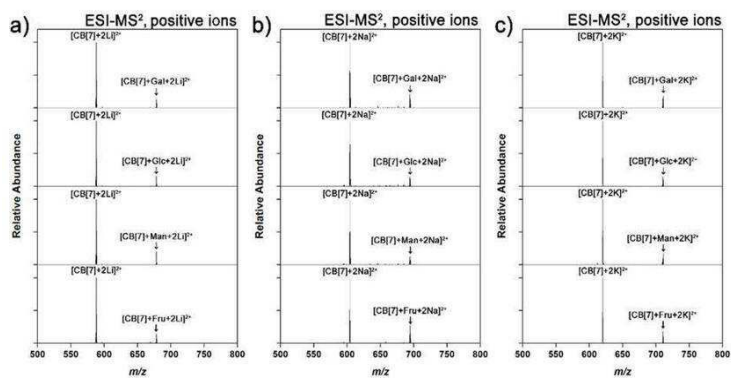
도면3



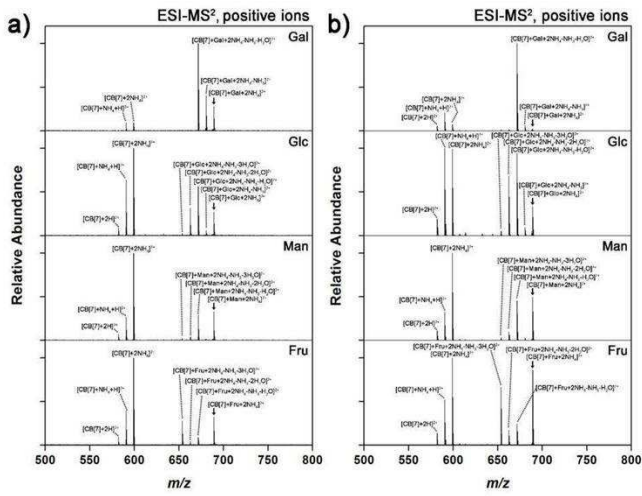
도면4



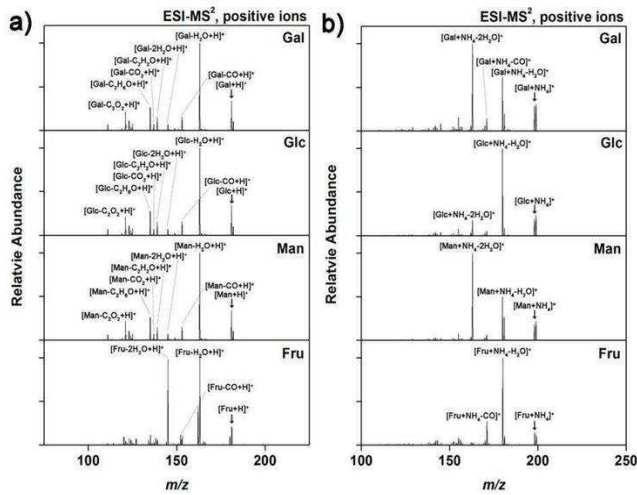
도면5



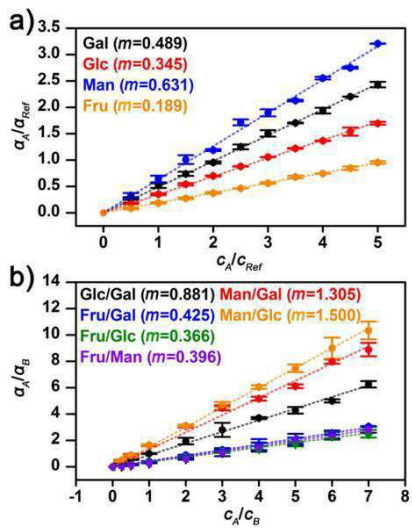
도면6



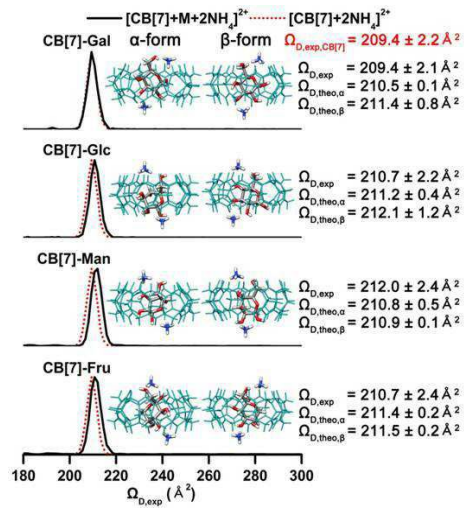
도면7



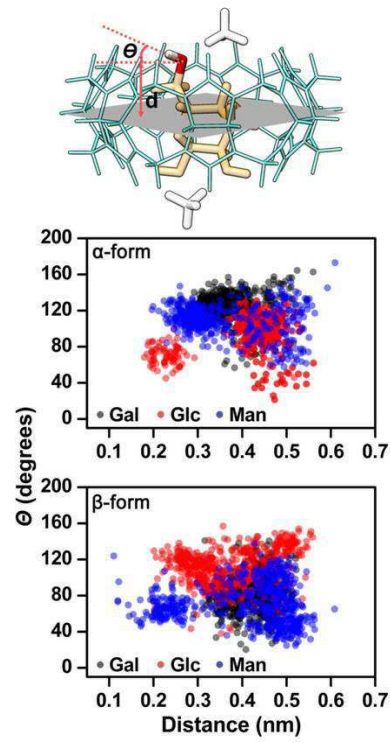
도면8



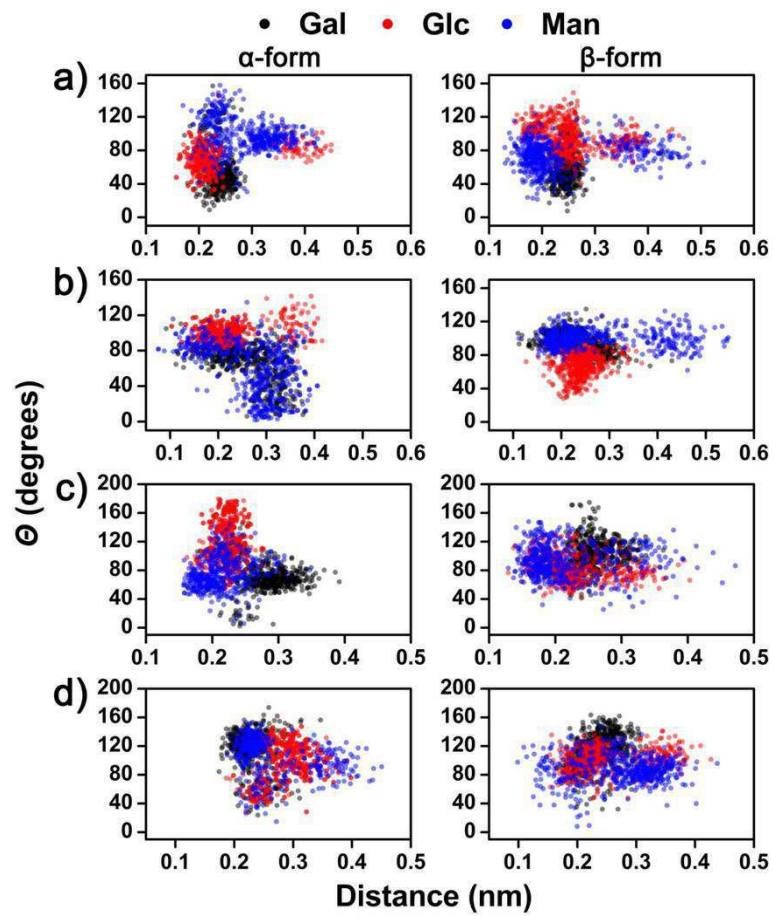
도면9



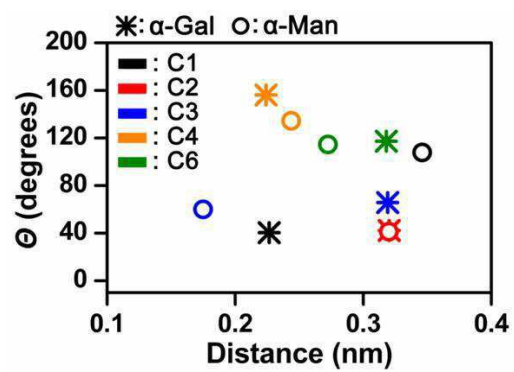
도면10



도면11



도면12



도면13

