(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0054282
(43) 공개일자 2025년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)
G01N 30/10 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 30/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0136993
(22) 출원일자 2023년10월13일
심사청구일자 2023년10월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)
서나리
대전광역시 유성구 어은로 57, 127동 1202호 (어은동, 한빛아파트)
조대식
대전광역시 유성구 궁동로2번길 17-7, 207호
(74) 대리인
강성혜

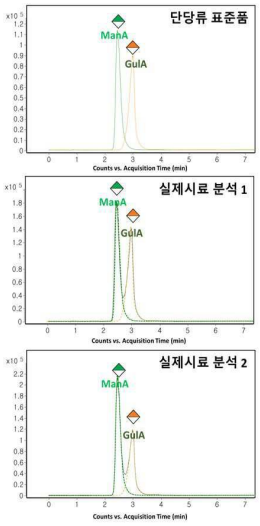
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **알긴산의 만누론산과 굴루론산 조성비 결정 방법**

(57) 요 약

본 발명은 알긴산을 구성하는 만누론산과 굴루론산의 구성 비율을 측정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 고부가가치 제품에 활용할 수 있도록 시판 중인 알긴산 표준품 및/또는 해조류 알긴산 추출물을 대상으로 알긴산의 물리·화학적 특성과 생물학적 기능을 결정짓는 만누론산과 굴루론산을 질량분석기반으로 선택적으로 정량 분석한 다음 조성비를 확인하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
G01N 33/50 (2013.01)
G01N 2030/027 (2013.01)
G01N 2400/44 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525014459
과제번호	PMS20220560
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 산업소재 국산화 기술개발
연구과제명	알긴산 국산화 대체를 위한 대량생산 및 공정표준화 기술개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

가) 약산성 조건 하에서 알긴산 포함 시료를 단당류로 가수분해하는 단계;

나) PGC (Porous Graphitic Carbon) 고체상 카트리지를 이용한 고체상 추출법으로 시료 중의 염을 제거하고 알긴산을 구성하는 두 종류의 단당류인 만누론산과 굴루론산을 선택적으로 정제 및 농축하는 단계;

다) 상기 나) 단계로부터 정제 및 농축된 시료를 용출하여 LC/MRM-MS (Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry) 탠덤 질량분석을 수행하여 만누론산과 굴루론산의 공통 이온과 특이적 이온을 모니터링하고 글루론산 특이적 전이 이온을 이용하여 만누론산과 굴루론산으로 분리하는 단계; 및

라) 도출된 탠덤 질량분석 크로마토그램의 면적을 통해 만누론산 및/또는 굴루론산의 개별 정량값을 도출하는 단계;를 포함하는 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 나) 단계의 고체상 추출법에서 용출은 트리플루오로아세트산(TFA)이 함유된 아세토나이트릴 용액으로 빠른 농도 구배로 수행하여 PGC 카트리지에 흡착한 단당류를 용출하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 다) 단계의 액체 크로마토그래피 (LC)는 포름산 포함 아세토나이트릴 완충액의 농도 구배로 만누론산과 굴로론산을 분리하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 다) 단계의 탠덤 질량분석은 사중극자 질량분석기 (QqQ-MS)의 첫 번째 4중극 (Q1)에서 해당되는 이온(precursor ion)으로 선택되고 두 번째 사중극 (Q2)의 충돌 셀에서 불활성 기체인 고순도 질소에 충돌 에너지를 가하여 선택된 이온을 단편화한 후 세 번째 4중극 (Q3)에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 선택된 이온만을 통과시켜 검출하는 단계로 분석이 이루어지는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 다) 단계에서 일정 농도 범위의 표준품 만누론산 및/또는 표준품 굴루론산 용액에 대하여 LC/MRM-MS 탠덤 질량분석을 추가 수행한 다음,

상기 라) 단계에서

(1) k = average{peak area(m/z 73 of G standard)/(m/z 147 of G standard)} 식으로 k 값을 얻는 단계;

(2) g = peak area{(m/z 147 of sample)xk} 식으로 g 값을 얻는 단계;

(3) 상기 (2) 단계에서 얻은 g 값을 굴루론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 굴루론산 정량 값을 도출하는 단계;

(4) m = peak area{(m/z 73 of sample)-g} 식으로 m 값을 얻는 단계; 및

(5) 상기 (4) 단계에서 얻은 m 값을 만누론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 만누론산 정량값을 도출하는 단계;를 포함하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 다) 단계에서 일정 농도 범위의 표준품 만누론산 및/또는 표준품 굴루론산 용액에 대하여 LC/MRM-MS 탠덤 질량분석을 추가 수행한 다음,

상기 라) 단계에서

(1) k = average{peak area(m/z 73 of G standard)/(m/z 147 of G standard)} 식으로 k 값을 얻는 단계;

(2) g = peak area{(m/z 147 of sample)xk} 식으로 g 값을 얻는 단계;

(3) 상기 (2) 단계에서 얻은 g 값을 굴루론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 굴루론산 정량 값을 도출하는 단계;

(4) m = peak area{(m/z 73 of sample)-g} 식으로 m 값을 얻는 단계;

(5) 상기 (4) 단계에서 얻은 m 값을 만누론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 만누론산 정량값을 도출하는 단계; 및

(6) M:G Ratio = {M 함량/(M 함량+G 함량)}x100 : {G 함량/(M 함량 + G 함량)}x100 식을 이용하여 상기 (3) 단계에서 얻은 글루론산 정량 값과 상기 (5) 단계에서 얻은 만누론산 정량 값을 위 식에 대입하여 M:G 비를 구하는 단계;를 포함하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

만누론산과 글루론산의 공통이온은 m/z 73, 굴루론산 특이적 전이 이온은 m/z 147인, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알긴산을 구성하는 만누론산과 굴루론산의 구성 비율을 측정하기 위한 방법에 관한 것으로서, 상세하게는 고부가가치 제품에 활용할 수 있도록 시판 중인 알긴산 표준품 및/또는 해조류 알긴산 추출물을 대상으로 알긴산의 물리·화학적 특성과 생물학적 기능을 결정짓는 만누론산과 굴루론산을 질량분석기반으로 선택적으로 정량 분석한 다음 조성비를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 한국에서는 미역, 다시마를 많이 양식하고 있어 해양생물 유래 소재 개발에 최적의 환경을 가지고 있다. 그러나 국내에서 사용되는 대부분의 알긴산은 중국 수입에 의존하고 있는 상태이므로 소재의 국산화가 필요한 상황이다. 또한, 알긴산은 결합구조와 분자량 크기에 따라 다양한 물성을 가지므로 이를 객관적으로 분석할 수 있는 기술이 있다면 다양한 용도 예컨대 식품, 화장품, 의약품 등에 맞는 알긴산을 제조할 수 있다.

[0004] 알긴산은 미역, 다시마 및 모자반과 같은 해조류에 약 15 - 35% 함유되어 있는 산성 점질 다당류로 250,000 Da - 350,000 Da의 분자량을 가지는 고도로 당쇄화(Glycosylation) 되어 있는 세포벽 구성 물질이다.

[0005] 알긴산은 만누론산(ß-D-mannuronic acid, 이하 "M"과 혼용함)과 굴루론산(α-L-gluronic acid, 이하 "G"와 혼용함)이 무작위로 결합되어 있는 고분자 다당체이며 (도 1), 알긴산의 물리·화학적 특성과 생물학적 기능은 구성하는 두 단당류의 양 및 비율과 밀접한 연관이 있다 (도 2).

[0006] 예를 들면, 만누론산의 비율이 높을 경우 부드러운 겔이 형성되고 반대로 굴루론산의 비율이 높은 경우 단단한 겔이 형성된다. 최근 들어 만누론산의 비율이 높은 재료로 만든 치과 보철물에 대해 면역반응이 나타났다는 보고들로 인해 알긴산을 구성하는 단당류의 비율과 함량이 주요 평가요소가 되고 있다.

[0007] 염료 고정제, 제제 첨가제, 응입제 등에 사용되는 일반 상용화용 알긴산의 판매가격은 US$ 5 - 20/kg이지만, 면역촉진제나 세포고정화용 겔형성제 등에 사용되는 의약품용 알긴산의 경우 US$ 40,000/kg 이상의 고부가가치를 지니고 있다.

[0009] 일반용과 의약품용 알긴산의 시험법은 동일하며, 식품의약품안전처 식품첨가물 공전 (식품의약품안전처 고시 제2023-29호(2023.04.28. 개정))에 기술되어 있는 알긴산 시험법은 수산화나트륨 용액과 에탄올을 가할 때 생기는 침전물로 알긴산을 정의하고, 그 함량을 확인하는데 머물러 있다.

[0010] 또한, 알긴산을 구성하는 단당류 2종인 만누론산과 굴루론산은 위치 이성질체로 5번 탄소 위치의 카르복시기 잔기의 방향에만 차이가 있어 질량 값이 동일하고 물리/화학적 특성이 매우 유사하기 때문에 알긴산 고유의 특성을 결정하는 두 단당류의 함량 및 구성 비율을 명확히 구별할 수 있는 표준화된 분석법은 현재 없는 실정이다.

[0011] 시중에 판매되는 유명 기업의 고가의 의료용 알긴산 표준품의 경우 특수 주파수 영역에서 나타는 특이적 분자 진동의 흡수 스펙트럼을 측정하는 적외선 분광법 (FT-IR)을 통해 도출된 만누론산과 굴루론산의 비율이 범위로만 제시되고 있어, 고부가가치 제품으로 활용하기 위한 알긴산 관련 품질 가이드라인 및 규정이 필요한 상황이다.

[0013] 중국특허 CN 110687154 B (2023.08.01. 등록)는 알지네이트 분해효소에 기반한 알지네이트 올리고당 서열분석 방법을 제공한다. 이 발명은 외절형 알지네이트 분해효소 AlyPB2를 이용하여 다당류 및 올리고당 기질을 분해할 때 비환원 말단에서 당을 하나씩 절단하는 특징을 이용하여 알지네이트 올리고당을 부분 효소 절단하고, 겔 여과 크로마토그래피로 분리하여 중합도가 다른 부분 효소 절단산물과 올리고당을 제조한 후, ^{1}H-NMR 기술을 이용하여 효소 절단산물과 생성물의 환원 말단과 비환원 말단의 글리코실 구조를 측정하여 단일 성분 또는 중합도가 균일한 다성분 알지네이트 올리고당의 조성과 구조를 결정한다. 이 발명은 알지네이트 올리고당의 조성과 구조를 결정함에 있어서, 단일 성분 또는 중합도가 균일한 다성분 알지네이트 올리고당을 분석 대상으로 하므로 모든 알긴산 분석에 적용할 수 없으며, 절차가 매우 복잡하다는 단점이 있다. 또한, 이 방법은 만누론산과 굴루론산 각각의 함량 및 비율 정보를 제공하지 않는다.

[0014] 중국특허 CN 112683888 B (2022.06.03. 등록)는 알긴산나트륨 올리고당 중합도 검출방법에 관한 것이며, 구체적인 방법은 흡광도법을 이용하여 알긴산나트륨 올리고당의 평균 중합도를 측정하고, NMR을 통해 상기 오차를 교정한 후, 흡광도 값을 통해 올리고당의 중합도를 직접 얻을 수 있으며, 해조류 올리고당의 평균 중합도 검출 공정을 단순화하여 해조류 올리고당의 산업적 생산, 분리 및 정제 과정에서의 평균 중합도 판정에 적합하다. 이 발명은 만누론산과 굴루론산 각각의 함량 및 비율 정보를 제공하지 않으며, 해조류 올리고당의 평균 중합도를 제공할 뿐이다.

[0015] 중국특허 CN 106442749 B (2019.06.21. 등록)는 갈조류 및 그 제품의 알긴산 함량의 검출 방법에 있어서, 고성능 액체 크로마토그래피를 사용하여 상기 갈조류에서 알긴산의 함량을 측정하는 것을 포함한다. 그러나, 이 방법은 만누론산과 굴루론산 각각의 함량 및 비율 정보를 제공하지 않는다.

[0016] 미국특허 US 11385174 B2 (2022.07.22. 등록)는 체액에서 알지네이트 올리고머를 정성적 및 정량적으로 검출하는 방법에 관한 것이다. 이 발명의 방법은 치료제로서 알지네이트 올리고머가 투여되는 대상체의 체내에서 알지네이트 올리고머 제제의 분포 및/또는 양을 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 이 발명의 방법은 가래와 같은 체액 샘플의 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR) 스펙트럼 분석을 기반으로 한다. 그러나, 이 방법은 만누론산과 굴

루론산 각각의 함량 및 비율 정보를 제공하지 않는다.

[0017] 한국특허 1395181 B (2014.05.08. 등록)는 알긴산으로부터 알긴산 유래 단량체 또는 중합체를 형성한다. 구체적으로, 알긴산 나트륨을 촉매의 존재 하에 100℃ 내지 200℃에서 5분 내지 30분 동안 반응시켜 알긴산 유래 단량체 또는 중합체를 형성한다. 상기 촉매는 산 촉매 또는 염기 촉매를 사용할 수 있으며, 예를 들어, 0.1 내지 10.0 wt% 황산(H_2SO_4) 또는 1 내지 10.0 wt% 탄산나트륨(Na_2CO_3)을 사용할 수 있고, 상기 알긴산 유래 단량체 또는 중합체는 고성능 액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography: HPLC)를 통해 확인될 수 있으며, 검출기로 RI 검출기(Refractive Index detector)를 사용하는 경우 알긴산 농도가 증가함에 따라 알긴산 유래 단량체 또는 중합체의 농도도 증가하는 경향을 나타낸다. 그러나, 이 방법은 만누론산과 굴루론산 각각의 함량 및 비율 정보를 제공하지 않는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명은 알긴산을 구성하는 위치 이성질체인 만누론산과 굴루론산의 분리 및 분석 방법의 문제점을 해결하고, 알긴산 조성물에 포함된 두 단당류의 함량 및 비율 결정을 통해 시중 판매 제품 또는 해조류 유래 알긴산에 대한 올바른 정보를 제공하고, 물리/화학적 특성과 생물학적 기능을 연관 지을 수 있는 고품질 제품을 생산할 수 있는 기반을 마련하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0021] 위와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명자들은 알긴산 조성물을 산 가수분해하여 유리된 단당류 중 알긴산을 구성하는 만누론산과 굴루론산을 특이적으로 선별한 다음, 식별과 정량을 동시에 수행할 수 있는 LC/MRM-MS 기반의 고선택적 고민감도 분석법을 발명하였다.

[0022] 본 발명의 분석방법은 크게 3가지 단계로 나눌 수 있다.

[0023] 첫째 단계는 알긴산 조성물을 가수분해한 다음 고체상 추출을 통해 선택적으로 만누론산과 굴루론산을 농축하는 과정이다.

[0024] 둘째 단계는 LC/MRM-MS (Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry)로 만누론산과 굴루론산을 분석하는 과정이다.

[0025] 세 번째 단계는 만누론산과 굴루론산 각각에 대하여 사중극자 질량분석기 (QqQ-MS)를 이용하여 특이적 탄뎀 이온 모니터링을 통해 도출된 크로마토그램의 면적 값을 기반으로 정량 분석을 수행하는 과정이다.

[0027] 본 발명은

[0028] 가) 약산성 조건에서 알긴산 포함 시료를 단당류로 가수분해하는 단계;

[0029] 나) PGC (Porous Graphitic Carbon) 고체상 카트리지를 이용한 고체상 추출법으로 시료 중의 염을 제거하고 알긴산을 구성하는 두 종류의 단당류인 만누론산과 굴루론산을 정제 및 농축하는 단계;

[0030] 다) 상기 나) 단계로부터 정제 및 농축된 시료를 용출하여 LC/MRM-MS (Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry) 탠덤 질량분석을 수행하여 만누론산과 굴루론산의 공통 이온과 특이적 이온을 모니터링하고 글루론산 특이적 전이 이온을 이용하여 만누론산과 굴루론산으로 분리하는 단계; 및

[0031] 라) 도출된 탠덤 질량분석 크로마토그램의 면적을 통해 만누론산 및/또는 굴루론산의 개별 정량값을 도출하는 단계;를 포함하는 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계의 액체 크로마토그래피 (LC)에서 포름산 포함 아세토나이트릴 완충액의 농도 구배로 만누론산과 굴루론산을 분리하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계의 탠덤 질량분석에서 사중극자 질량분석기 (QqQ-MS)의 첫 번째 4중극 (Q1)에서

해당되는 이온 (precursor ion)으로 선택되고 두 번째 사중극 (Q2)의 충돌 셀에서 불활성 기체인 고순도 질소에 충돌 에너지를 가하여 선택된 이온을 단편화한 후 세 번째 4중극 (Q3)에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 선택된 이온만을 통과시켜 검출하는 단계로 분석이 이루어지는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계에서

[0035] 일정 농도 범위의 표준품 만누론산 및/또는 표준품 굴루론산 용액에 대하여 LC/MRM-MS 탠덤 질량분석을 추가 수행한 다음,

[0036] 상기 라) 단계에서

[0037] (1) k = average{peak area(m/z 73 of G standard)/(m/z 147 of G standard)} 식으로 k 값을 얻는 단계;

[0038] (2) g = peak area{(m/z 147 of sample)xk} 식으로 g 값을 얻는 단계;

[0039] (3) 상기 (2) 단계에서 얻은 g 값을 굴루론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 굴루론산 정량 값을 도출하는 단계;

[0040] (4) m = peak area{(m/z 73 of sample)-g} 식으로 m 값을 얻는 단계; 및

[0041] (5) 상기 (4) 단계에서 얻은 m 값을 만누론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 만누론산 정량값을 도출하는 단계;를 포함하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계에서 일정 농도 범위의 표준품 만누론산 및/또는 표준품 굴루론산 용액에 대하여 LC/MRM-MS 탠덤 질량분석을 추가 수행한 다음,

[0043] 상기 라) 단계에서

[0044] (1) k = average{peak area(m/z 73 of G standard)/(m/z 147 of G standard)} 식으로 k 값을 얻는 단계;

[0045] (2) g = peak area{(m/z 147 of sample)xk} 식으로 g 값을 얻는 단계;

[0046] (3) 상기 (2) 단계에서 얻은 g 값을 굴루론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 굴루론산 정량 값을 도출하는 단계;

[0047] (4) m = peak area{(m/z 73 of sample)-g} 식으로 m 값을 얻는 단계;

[0048] (5) 상기 (4) 단계에서 얻은 m 값을 만누론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 만누론산 정량값을 도출하는 단계; 및

[0049] (6) M:G Ratio = {M 함량/(M 함량+G 함량)}x100 : {G 함량/(M 함량+G 함량)}x100 식을 이용하여 상기 (3) 단계에서 얻은 글루론산 정량 값과 상기 (5) 단계에서 얻은 만누론산 정량 값을 위 식에 대입하여 M:G 비를 구하는 단계;를 포함하는, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

[0050] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계에서 만누론산과 글루론산의 공통이온 m/z 73과 굴루론산 특이적 전이 이온이 m/z 147인, 알긴산의 만누론산 및/또는 굴루론산 정량 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0052] 본 발명은 알긴산을 구성하는 위치 이성질체인 만누론산과 굴루론산의 동시 정량을 위한 시료 제조방법, 불순물의 효과적 제거, 고선택적 정성·정량방법을 제공한다.

[0053] 본 발명에 따르면, 단당류 검출을 위해 고전적으로 수행되었던 유도체화 과정 없이 액체 크로마토그래피를 이용하여 한 번의 분석으로 만누론산과 굴루론산을 분리하고, MRM (Multiple Reaction Monitoring)을 기반으로 분자량이 동일하고 구조에 큰 차이가 없는 두 종류의 단당류를 특이적으로 정성 및 정량할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명은 알긴산을 구성하는 두 가지 단당류를 측정하여 각 단당류의 정확한 함량 및 두 단당류의 비율을 제공할 수 있다. 본 발명은 식/의약 신소재로 사용될 수 있는 알긴산의 물리화학적 특성 확인 방법으로 실용화될 수 있다.

[0055] 또한, 본 발명의 방법에 따르면 알긴산의 물리화학적 성질과 생리학적 역할을 결정짓는 주요 요인인 단당류 구

성비를 정확하게 결정지을 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명의 방법에 따르면 질량분석에서 감도와 선택성 향상을 위해 알긴산 조성물에 대해 최적의 산 가수분해 조건 하에서 유리된 단당류 중 비대상 요인들을 제거하고, 알긴산을 구성하는 두 단당류인 만누론산과 굴루론산을 선택적으로 선별할 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명의 방법에 따르면 추가 유도체화 단계 없이 LC/MRM-MS (Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry) 기반으로 위치 이성질체인 만누론산과 굴루론산의 분리 및 특이적 이온의 선택적 모니터링 조합을 통해 좀 더 빠르게 정성 및 절대 정량 정보를 함께 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 알긴산의 구조와 구성 단당류 만누론산과 굴루론산의 구조를 나타낸다.

도 2는 알긴산의 단당류 배열에 따른 물리적 성질 차이를 예시한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 흐름도이다.

도 4는 특이적 전이 이온 확인 결과이다.

도 5는 본 발명의 방법에 따른 알긴산 분석 결과를 예시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0062] **[실시예 1] 약산 가수분해를 통한 탄수화물 폴리머 알긴산의 단당류 형태로의 변환**

[0063] 1. 알긴산 시료 50㎍에 200㎕ 1M HCl을 넣고 용해한 다음, heating block에서 100℃로 4시간 동안 반응시켜 가수분해를 진행하였다.

[0064] 2. 진공 농축기를 사용하여 가수분해가 완료된 시료를 완전히 건조하였다.

[0065] 3. 건조된 시료에 1mL의 3차 증류수를 넣어 재용해하였다 (pH 6.8).

[0067] **[실시예 2] PGC-고체상 추출법을 이용한 염 제거 및 만누론산과 굴루론산 선택적 농축**

[0068] 1. PGC (Porous Graphitic Carbon, 이하 "PGC"와 혼용함) 충진 카트리지 세척 및 최적화

[0069] ① PGC 카트리지를 3차 증류수 3 mL로 2회 세척하였다.

[0070] ② PGC 카트리지를 0.1% 트리플루오로아세트산 (이하 "TFA")이 함유된 80% 아세토나이트릴 (이하 "ACN") 용액 3 mL로 2회 세척하였다.

[0071] ③ PGC 카트리지를 3차 증류수 3 mL로 2회 세척하였다.

[0073] 2. 샘플 로딩 및 정제

[0074] ① 상기 실시예 1에서 얻은 재용해된 시료 1mL를 PGC 카트리지에 로딩하였다.

[0075] ② 이후 3 mL 3차 증류수로 PGC 카트리지를 2회 세척하여 염 및 불순물을 제거하였다.

[0077] 3. 만누론산과 굴루론산 추출

[0078] ① 0.1% TFA가 든 40% ACN 용액 3 mL로 PGC 카트리지에 흡착한 시료를 2회 용출하였다.

[0079] ② 진공 농축기를 사용하여 용출된 용액을 완전히 건조한 다음 3차 증류수 50 μL에 재용해하였다.

[0081] **[실시예 3] LC/MRM-MS을 이용한 알긴산 내 만누론산과 굴루론산 분석**

[0082] 1. 유도체화하지 않은 만누론산과 굴루론산의 분리·분석을 위해 PGC (Porous Graphitic Carbon)가 충진된 2.1×100 ㎜, 3㎛ 분석 컬럼을 사용하였다.

[0084] 2. 크로마토그래피 방법에 의한 분리는 최적화된 기울기 용매 조건에 따라 수행하였다. 시료를 로딩한 후, 빠른 용출 농도구배 용액을 분당 0.3μL씩 흘려주었다. 용매 A는 3차 증류수에 0.3% 포름산이 용해된 완충액이며, 용매 B는 90% 아세토나이트릴에 0.3% 포름산이 용해된 완충액이다. 기울기 용매조건은 다음과 같다: 0~0.5 min; 0% B, 0.5~15 min; 0~16% B, 15~18 min; 16~100% B, 18~23 min; 100% B, 23~25 min; 100~0% B, 25~35 min; 0% B.

[0086] 3. 위와 같이 액체 크로마토그래피로 분리된 알긴산을 구성하는 2종의 단당류인 만누론산과 굴루론산은 이후 사중극자 질량분석기 (QqQ-MS)의 첫 번째 4중극 (quadrupole; Q1)에서 해당되는 이온 (precursor ion)으로 선택되고 충돌 셀 (collision cell 즉, 두 번째 4중극; Q2)에서 고순도 질소 (inert gas)에 에너지 (collision energy)를 가하여 선택된 이온을 단편화 (fragmentation) 시킨 후 세 번째 4중극 (Q3)에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 이온 중 선택된 이온만을 통과시켜 검출하는 단계로 분석이 이루어졌다.

[0087] 전이 이온 정보는 표 1과 같다. 표 1의 MRM Transition Ion 항목은 모니터링된 전이 이온 *m/z* 값을 나타낸다. 표 2는 시판 중인 알긴산 표준품을 본 발명의 방법으로 정량한 결과를 나타낸다.

표 1

[0089]

Compound	Precursor ion (*m/z*), $[M-H]^-$	MRM Transition Ion (*m/z*), $[M-H]^-$	Collision Energy (CE)
만누론산 (β-D-mannuronic acid)	193.0	73	10
굴루론산 (α-L-guluronic acid)	193.0	73, 147	10

표 2

[0091]

표준품	만누론산 (g/kg)	굴루론산 (g/kg)	표준오차 (CV%)	M/G 비율(%)	판매시 제품에 표시된 M/G 비율 (%)
D사 1	52.7	84.7	4.4	36.9/63.1	23-35/65-75
D사 2	82.7	71.3	8.0	53.7/46.3	60-70/30-40

[0092] (M/G는 만누론산 (β-d-mannuronic acid, M)/굴루론산 (α-L-guluronic acid, G) 비율을 나타낸다.)

[0094] **[실시예 4] 표준품의 크로마토그램과 비교를 통한 정량 데이터 도출**

[0095] 1. 1~100ng/μL 농도 범위의 만누론산 표준품, 굴루론산 표준품과 시험 대상 알긴산 조성물 각각을 LC/MRM-MS로 분석하였다.

[0096] 2. 다음의 수식에 값을 대입하여 샘플의 만누론산과 굴루론산의 정량을 수행하였다.

[0097] (1 단계)

[0098] k = average{peak area(m/z 73 of G standard)/(m/z 147 of G standard)},

[0099] (2 단계)

[0100] g = peak area{(m/z 147 of sample)xk},

[0101] (3 단계)

[0102] 상기 2 단계에서 얻은 g 값을 굴루론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 굴루론산 정량 값을 도출하였다.

[0103] (4 단계)

[0104] m = peak area{(m/z 73 of sample)-g},

[0105] (5 단계)

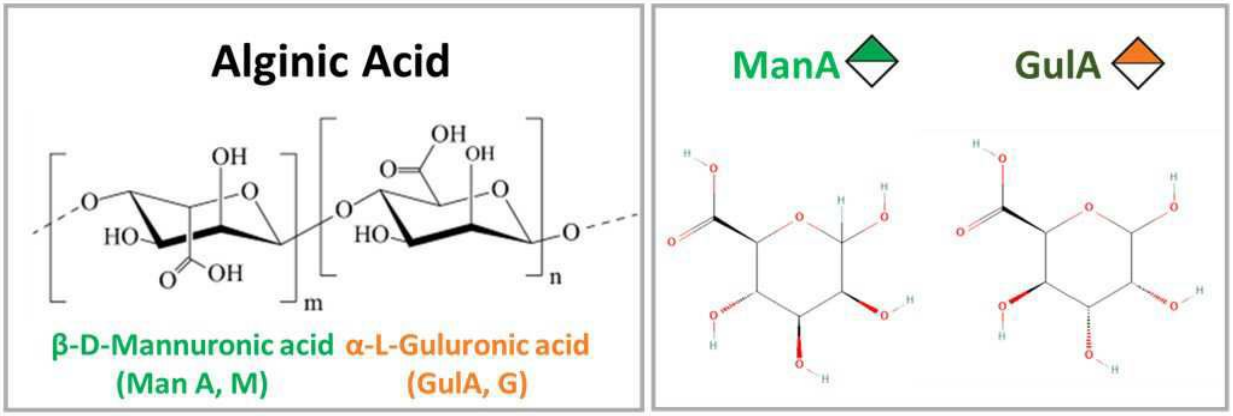
[0106] 상기 4 단계에서 얻은 m 값을 만누론산 표준품으로 작성된 검량곡선에 대입하여 만누론산 정량값을 도출하였다.

[0107] (6 단계) M:G Ratio = {M 함량/(M 함량+G 함량)}x100 : {G 함량/(M 함량+G 함량)}x100,

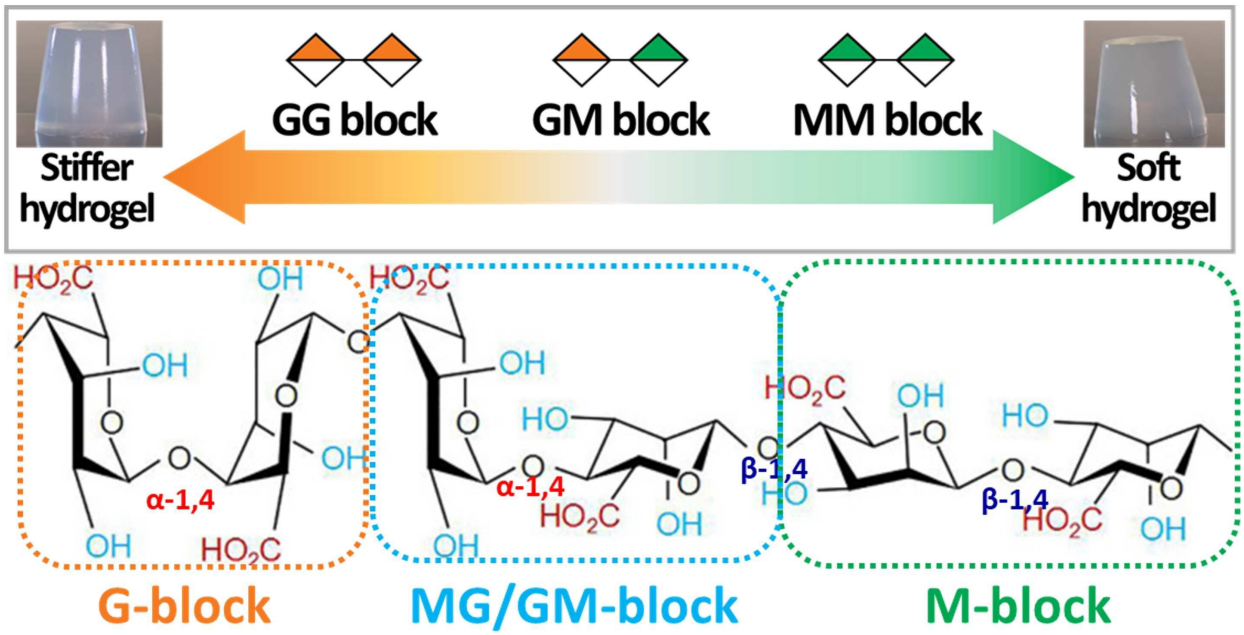
[0108] 상기 3 단계에서 얻은 굴루론산 정량 값과 상기 5 단계에서 얻은 만누론산 정량 값을 위 식에 대입하여 M:G 비를 구하였다.

도면

도면1



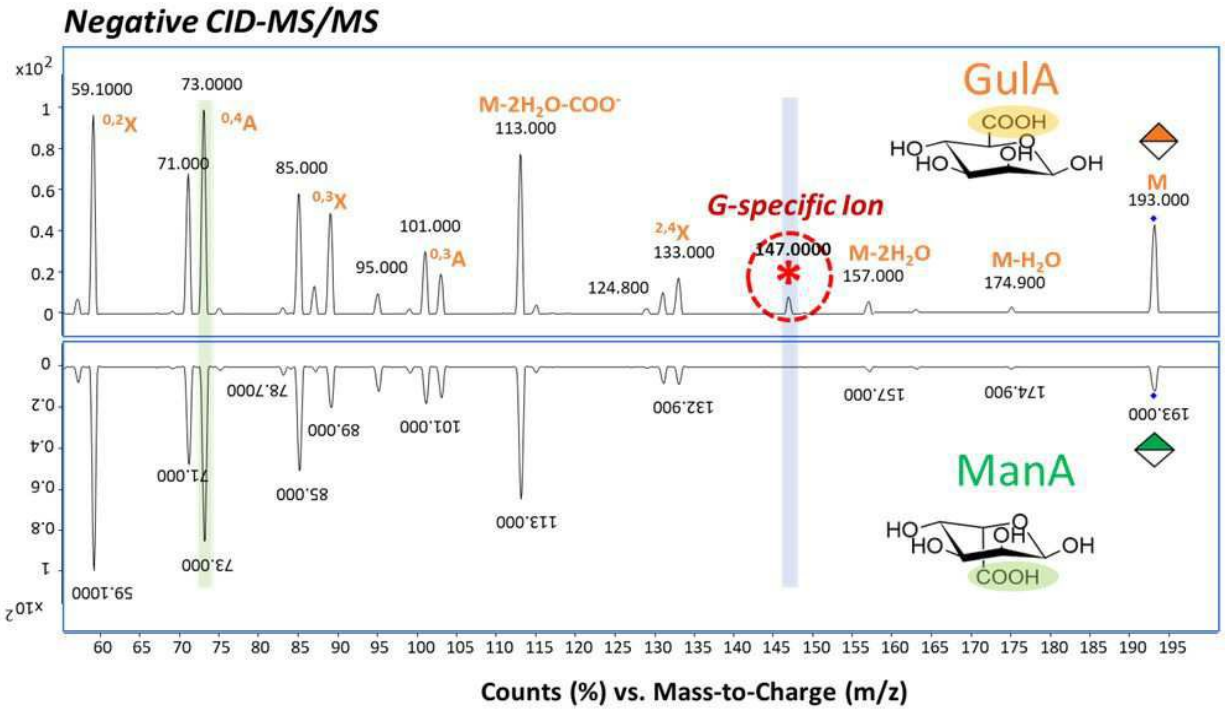
도면2


GG block
GM block
MM block
Stiffer hydrogel
Soft hydrogel
α-1,4
β-1,4
G-block
MG/GM-block
M-block

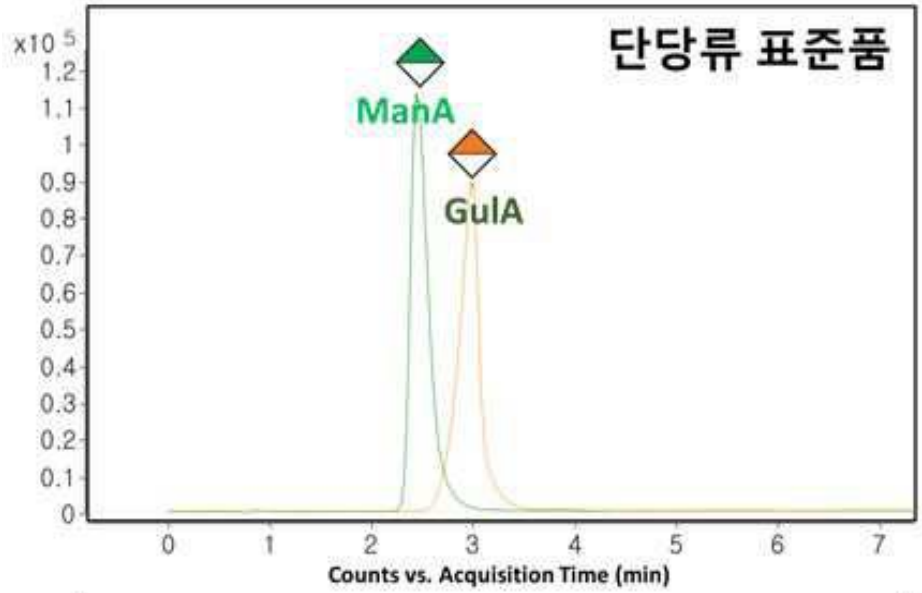
도면3

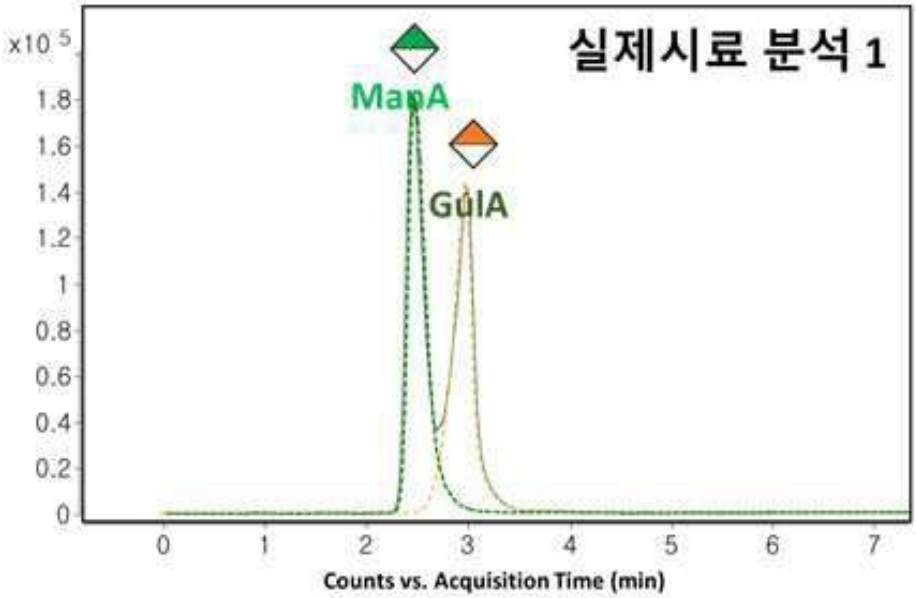

① 샘플
② 산가수분해
③만누론산, 굴루론산 선택적 정제 및 농축 (PGC-SPE)
④ 특이적 전이이온을 이용한 LC-MRM MS 분석
⑤ 정량 데이터 도출

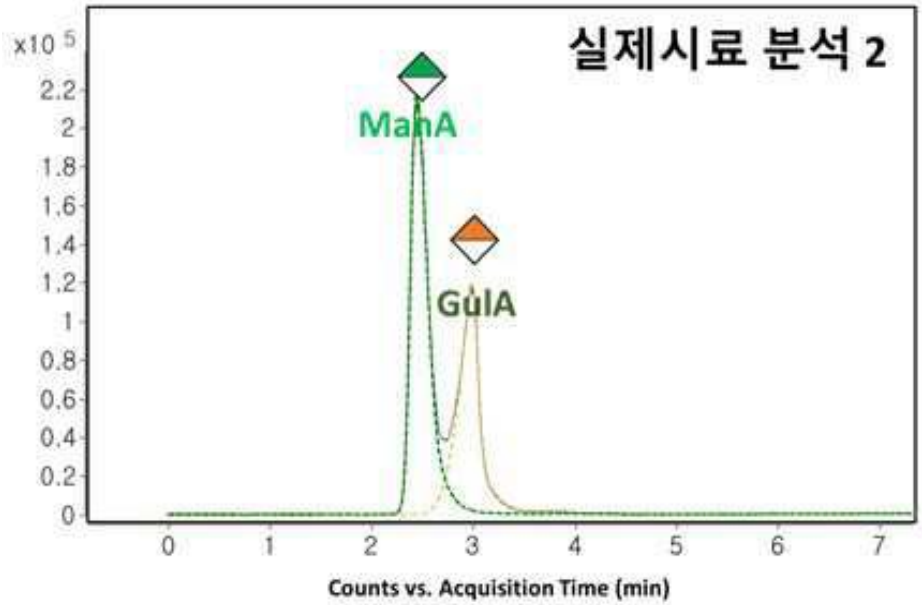
도면4


Negative CID-MS/MS
GulA
ManA
G-specific Ion
59.1000
73.0000
71.000
85.000
95.000
101.000
113.000
124.800
133.000
147.0000
157.000
174.900
193.000
M-2H2O-COO-
M-2H2O
M-H2O
M
0,2X
0,4A
0,3X
0,3A
2,4X
COOH
Counts (%) vs. Mass-to-Charge (m/z)

도면5


단당류 표준품
ManA
GulA
x10 5
Counts vs. Acquisition Time (min)


실제시료 분석 1
ManA
GulA
x10 5
Counts vs. Acquisition Time (min)


실제시료 분석 2
ManA
GulA
x10 5
Counts vs. Acquisition Time (min)