(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 6 월 26 일 (26.06.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/098526 A1

(51) 국제특허분류:
C01B 17/00 (2006.01) *C01B 17/027* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2013/011971

(22) 국제출원일: 2013 년 12 월 20 일 (20.12.2013)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2012-0150109 2012 년 12 월 20 일 (20.12.2012) KR
10-2013-0159867 2013 년 12 월 20 일 (20.12.2013) KR

(71) 출원인: **한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE)** [KR/KR]; 305-340 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **임용현 (YIM, Yong Hyeon)**; 305-721 대전시 유성구 가정로 63, 103 동 1306 호, Daejeon (KR). **이현석 (LEE, Hyun Seok)**; 302-805 대전시 서구 신갈마로 240 번길 31, 104 호, Daejeon (KR). **김숙헌 (KIM, Sook Heun)**; 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448, 205 동 607 호, Daejeon (KR). **이경석 (LEE, Kyoung Seok)**; 305-750 대전시 유성구 반석서로 98, 603 동 204 호, Daejeon (KR). **정지선 (JEONG, Ji Seon)**; 301-758 대전시 중구 계룡로 852, 22 동 1105 호, Daejeon (KR). **김숙경 (KIM, Sook-Kyoung)**; 305-315 대전시 유성구 봉명로 48, 803 동 402 호, Daejeon (KR).

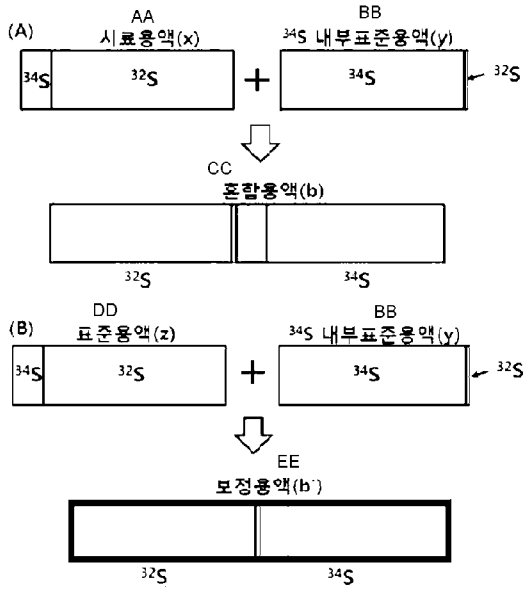
(74) 대리인: **권오식 (KWON, Oh-Sig)** 등; 302-828 대전시 서구 한밭대로 809 10 층, Daejeon (KR).

(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, 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, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: QUANTIFICATION METHOD FOR SULPHUR-CONTAINING ORGANIC COMPOUND

(54) **발명의 명칭** : 황이 함유된 유기화합물의 정량방법



AA ... Sample solution (x)
BB ... ^{34}S internal standard solution (y)
CC ... Mixed solution (b)
DD ... Standard solution (z)
EE ... Calibration solution (b')

(57) **Abstract**: The present invention relates to a quantification method for a sulphur-containing organic compound. Sulphur containing compounds can be quantified by means of the quantification method of the present invention without limitation, but, preferably, the present invention is relatively effective in quantifying organic compounds that are difficult to quantify such as those which are hygroscopic or take the form of hydrides, or else macromolecules such as biological materials. Further, among biological materials, the quantification method of the present invention can highly effectively quantify peptides or peptide high-purity standard substances.

(57) **요약서**: 본 발명은 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다. 황이 함유된 화합물은 제한없이 본 발명의 정량방법으로 정량하는 것이 가능하지만, 바람직하게는 생체 물질과 같은 거대분자 또는 흡습성이 있거나 수화물 형태인 경우와 같이 정량이 어려운 유기화합물을 정량하는데 보다 효과적이다. 본 발명의 정량방법은 생체 물질 중에서도 펩티드 또는 단백질의 고순도 표준물질을 매우 효과적으로 정량할 수 있다.

WO 2014/098526 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, 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 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 황이 함유된 유기화합물의 정량방법

기술분야

[1] 본 발명은 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 본 발명은 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다. 일반적으로, 정량분석의 정확성과 소급성(traceability)은 실험결과들에 대한 신뢰도 및 실험간 상호비교 가능성을 결정하는 척도로서 매우 중요한 의미를 갖는다. 특히, 유기화합물 및 생체물질의 정량분석에서 측정 소급성(traceability)을 갖는 고순도 표준물질의 확보가 선행되지 않을 때 측정의 신뢰성이 심각하게 영향을 받을 수 있다. 고순도 표준물질 또는 표준용액의 정량값은 해당물질에 대한 다양한 순도분석 결과를 바탕으로 무게 법에 의해 제조하고 순도가 보정된 제조 값을 사용한다. 또 다른 방법으로 생체분자와 같이 복잡한 물질의 경우에는 생체분자의 기본단위인 핵산 단량체/아미노산 등 유기화합물 수준의 고순도 표준물질을 위와 같은 방법으로 확보하고 이를 기준으로 사용하여 고순도 생체물질의 특성값 또는 정량 값을 얻는 방법이 사용되고 있다. 예를 들어 단백질 표준물질/표준용액 정량의 경우 단백질을 펩티드 단위로 효소 분해하여 펩티드를 정량하는 방법도 많이 사용되고 있으나 이를 위해서는 정확한 함량이 주어진 펩티드 표준물질이 필요하다. 펩티드나 단백질 고순도 표준물질의 경우 각각을 가수분해하여 생성되는 아미노산의 정량을 통해 펩티드나 단백질의 함량을 결정하는 방법도 널리 활용되고 있다(*J. Chromatography A*, **1218**, 6596-6602 (2011)). 그러나 이 방법을 사용하기 위해서는 정량에 사용되는 아미노산의 표준물질이 확보되어 있어야 하며 단백질/펩티드가 아미노산으로 가수분해되는 과정에서의 효율이 100 %에 근접함이 보장되도록 가수분해 조건이 확립되어야 한다. 상기 생체물질의 정량방법을 확립하기 위한 기술의 일례로서, DNA를 정량하기 위하여, 효소를 사용하여 핵산 단량체로 잘라내고 이들을 동위원소 희석 HPLC-MS로 정량하는 법을 시도한 바 있다. (O'Connor, G., et. al..,*Anal.Chem.*, **74**, 3670-3676 (2002)) 또한, 단백질의 경우, UV 흡광도 측정방법, Biuret 방법, BCA 방법, Lowry 방법 또는 Bradford 방법 등을 주로 활용하여 단백질을 정량하고 있으나, 감도 및 역동범위(dynamic range)의 문제를 해결하지 못한 실정이다. 또한, 흡습성이 강하거나 수화물 형태의 유기화합물은 시료 내에 포함된 물 분자의 수에 따라 질량이 달라지므로 정확한 질량을 측정하는 것은 매우 어려운 일이다.

[3]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명의 목적은 황을 함유하는 유기화합물의 정량 방법을 제공하는 것이다. 보다 상세하게는 황을 함유하는 유기화합물, 메티오닌, 시스테인 또는 둘 다를 포함하는 펩티드나 단백질 및 황이 포함되도록 변형된 DNA, RNA 또는 PNA 중에서 선택된 생체물질의 정량 방법을 제공하는 것이다. 특히 상기 유기화합물 또는 생체물질이 수화물 형태로 존재하거나 흡습성이 있는 경우, 기존의 방법으로는 순도가 확인된 고순도 유기화합물 또는 표준물질로부터 무게법으로 제조한 제조값의 신뢰성이 떨어지는 문제점을 해결하는 효과적인 수단을 제공한다.

[5]

과제 해결 수단

[6] 본 발명은 황 동위원소 비를 이용한 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 하기 단계 (1) 내지 (4)를 포함하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다.

[7] (1) 황이 함유된 유기화합물을 포함하는 시료용액을 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액으로 희석하여 시료용액에서 자연존재비가 가장 큰 기준 동위원소(^{32}S)와의 이론적 동위원소 비가 0.2 내지 5 사이의 값이 되도록 시료혼합용액을 제조하는 단계;

[8] (2) ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 상기 내부표준용액과 자연존재비를 갖는 황 표준용액을 혼합하여 이론적 동위원소 비가 상기 단계 (1)에서 제조된 혼합용액과 동일한 값이 되도록 보정용액을 제조하는 단계;

[9] (3) 상기 단계 (1)에서 제조된 혼합용액에서 황이 함유된 유기화합물을 분해하여 무기물 형태의 황산화물(sulfate)을 회수하는 단계; 및

[10] (4) 상기 단계 (3)에서 회수된 황산화물의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소와 ^{32}S의 동위원소 비를 측정하고, 상기 단계 (2)에서 제조된 보정용액의 해당 동위원소 비를 측정하는 단계.

[11] 상기 황이 함유된 유기화합물은 메티오닌, 시스테인 등의 유기화합물 뿐 만 아니라 메티오닌, 시스테인 또는 둘 다를 포함하는 단백질 또는 펩티드인 것이다.

[12] 상기 단계 (3)에서, 황이 함유된 유기화합물을 포함하는 시료혼합용액에 전자파 조사와 산분해를 동시에 처리하여 무기물 형태의 황산화물로 분해하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 상기 전자파 조사와 산분해를 동시에 처리하는 것은 전자파 오븐에 넣어 10분 내지 240 분 동안 100 내지 300℃ 에서 유지하면서 산분해 하고, 추가로 반복하여 전자파 오븐 처리를 하는 것을 포함한다. 전자파조사와 산분해를 동시에 처리하는 것은 효과적으로 황을 무기원소 형태로 분해 할 수 있는 방법이지만, 이에 한정하지 않고 다양한 조건으로 황을 무기물 형태로 분해해도 무방하다. 산분해를 위해서는

유기화합물의 구성원소를 모두 무기원소 형태로 전환시키기에 충분한 산화제를 넣어주어야 한다. 상기 황이 함유된 유기화합물을 구성하는 탄소, 수소, 질소 및 황 원자의 총 몰수를 1로 기준하였을 때, 산화제의 몰 비가 적어도 10배 이상 되도록 사용하는 것이 바람직하다. 상기 산화제는 황산을 제외한 산화제를 사용하는 것이 특징이며, 바람직한 일례로는 질산, 과염소산, 과산화수소수 또는 이들의 혼합물이 있다.

[13] 10배 미만 몰 비의 산화제를 첨가하는 경우, 산분해가 충분하게 일어나지 않을 수 있으며, 초과하는 경우에는 큰 문제는 없으나, 최종 분석 용액의 산농도가 10 중량%를 넘지 않는 것이 ICP/MS 분석에 적합하다.

[14] 상기 단계(4)에서 획득된 시료혼합용액의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소와 ^{32}S의 동위원소 비와 보정용액의 해당 동위원소 비를 하기 <식 1>에 적용하여 측정하고자 하는 시료용액의 농도를 획득하는 것이 특징이다.

[15] <식 1>

[16]
$$C_x = \left\{ C_z \cdot \frac{m_z\, m_y}{w\, m_z\, m_y'} \cdot \frac{R_y - R_b}{R_b - R_x} \cdot \frac{R_{b'} - R_z}{R_y - R_{b'}} \cdot \frac{\sum_i R_{xi}}{\sum_i R_{zi}} \right\} - (C_{blank})$$

[17] C_x: 측정하고자 하는 시료용액(x)의 농도,

[18] m_x: 저울을 이용하여 측정된 시료용액(x)의 질량,

[19] m_y: 시료용액(x)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

[20] m_y': 보정용 황 표준용액(z)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

[21] C_z: 보정용 황 표준용액(z)의 농도

[22] R_x: 시료용액(x)에 존재하는 황의 동위원소 비율 (^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[23] R_y: ^{34}S 농축 내부표준용액(y)에 존재하는 황의 동위원소 비율 (^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[24] R_z: 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 동위원소 비율 (^{34}S, ^{33}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[25] R_{xi}: 시료용액(x)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$, $^{36}S/^{32}S$)

[26] R_{zi}: 보정용 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$ 또는 $^{36}S/^{32}S$)

[27] R_b: 시료혼합용액의 황 동위원소 비율(^{34}S, ^{33}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[28] $R_{b'}$: 보정용액의 황 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중 중에서 선택된 어느 하나의

동위원소/^{32}S 동위원소)

[29] w: 건조질량 보정인자

[30] C_{blank}: 바탕시료의 농도

[31]

발명의 효과

[32] 본 발명은 황이 함유된 유기화합물의 정량 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 정량하고자 하는 유기화합물에 황의 동위원소 중 한가지(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중)가 농축된 무기물 형태의 황 용액을 내부표준물질로 첨가하여 시료혼합용액을 만들고 황 원소 표준용액에도 같은 내부표준물질을 첨가한 보정용액을 만든 다음 시료혼합용액과 보정용액의 황 동위원소 비를 비교 측정함으로써 유기화합물을 정량하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 거대분자인 생체물질, 특히 메티오닌이나 시스테인을 포함하는 펩티드 또는 단백질의 정량에서 매우 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 정확한 정량이 어려운 흡습성이 강하거나 수화물 형태의 유기화합물을 정량 시 매우 유용하게 사용될 수 있는 정량 방법이다.

[33] 본 발명의 정량방법은 특히 유기화합물이나 단백질/펩티드 등의 고순도 일차표준물질에 대한 신뢰성이 높고 일관성 있는 정량 결과를 제공할 수 있어 고순도 표준용액의 특성 분석과 측정표준 확립에 활용될 수 있다. 이렇게 만들어진 표준용액은 다양한 유기화합물과 생체분자의 정량분석을 위한 보정용 표준용액으로 사용되어 정량 결과의 신뢰성을 확보하는데 활용될 수 있다.

[34]

도면의 간단한 설명

[35] 도 1의 (A)는 황 동위원소 자연 존재비($^{34}S/^{32}S$)를 갖는 시료용액(x)과 ^{34}S 고농축 내부표준용액(y)으로 이루어진 시료혼합용액(b)을 나타낸 모식도이고, (B)는 황 원소 표준용액(z)과 ^{34}S 고농축 내부표준용액(y)으로 이루어진 보정용액(b')을 나타낸 모식도이다.

[36] 도 2는 동위원소 희석 유도결합 플라스마 질량분석법(ICP/MS)을 이용한 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 대한 개념도이다.

[37] 도 3은 황 동위원소 희석시 시료혼합용액과 보정용액의 동위원소 비율과 error magnification factor(EMF)의 관계를 나타내는 그래프이다. R은 황 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$)이다.

[38] 도 4는 황 동위원소 측정 기반 인성장호르몬의 정량결과를 나타낸 것이다.

[39] (A)는 1차 배치에서 제조된 인성장호르몬의 정량결과이고, (B)는 황 동위원소 기반 정량과 아미노산 기반 정량 결과를 비교한 것으로 I, F, P, V는 각각 단백질을 아미노산 수준으로 가수분해한 후 isoleucine, phenylalanine, proline, valine을 정량하여 단백질의 함량을 산출한 결과이다.

[40] 도 5는 인성장호르몬의 SEC-UV 크로마토그램이다. 3.3분의 주 피크는

인성장호르몬의 피크이고 4.1분의 작은 피크는 작은분자에 해당한다.

[41] 도 6은 용매 내에 포함된 적은양의 황 포함 불순물 분석을 위해 SEC으로 분리한 성분들을 ICP/MS에 연결하여 황 원소에 해당하는 m/z 32와 34만을 모니터한 결과이다. 3.3분의 인성장호르몬 분자에 해당하는 피크 이후의 작은 황 포함 불순물에 의한 피크는 보이지 않는다.

[42] 도 7은 2차 배치에서 제조된 인성장호르몬의 황 동위원소 기반 정량결과 및 아미노산 기반 정량결과이다.

[43] 도 8은 인성장호르몬 T2 펩티드의 황 동위원소 기반 정량결과 및 아미노산 기반 정량결과이다.

[44] 도 9는 인성장호르몬 T11 펩티드의 황 동위원소 기반 정량결과 및 아미노산 기반 정량결과이다.

[45] 도 10은 메티오닌의 황 동위원소 기반 정량 결과이다.

[46] 도 11은 시료 전처리법에 따른 NIST SRM 2389a시료의 황 동위원소 기반 정량 결과이다.

[47] 도 12는 2차 배치에서 제조된 인성장호르몬의 균질도 평가 결과이다.

[48] 도 13은 2차 배치에서 제조된 인성장호르몬의 황 동위원소 기반 인증결과 및 아미노산 혹은 펩타이드 기반 정량 결과이다.

[49]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[50] 본 발명은 황 동위원소 비를 이용한 황이 함유된 유기화합물의 정량방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 유기화합물에 함유된 황 동위원소 비를 측정하고, 측정된 황 동위원소 비로부터 황이 함유된 유기 화합물을 양을 계산하는 정량방법에 관한 것이다. 상기 유기화합물에 함유된 황 동위원소 비를 측정하는 방법은 유도결합 플라스마 질량분석기를 이용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[51] 자연계에 존재하는 황은 ^{32}S, ^{33}S, ^{34}S, ^{36}S의 4 종류의 동위원소가 알려져 있고, 그 중에서 대부분을 차지하는 동위원소인 ^{32}S는 95.02%, ^{34}S는 4.21%를 차지하고 있다. 본 발명은 시료용액(x)에서 유기화합물 내에 함유된 황 동위원소 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소와 ^{32}S의 비를 이용하는 것이 특징이며, 보다 상세하게는 상기 시료용액에 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)을 넣어 희석한 시료혼합용액(b)의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소 비(R_b)와, 황 표준용액(z)과 상기와 동일한 내부표준용액(y)으로 이루어진 보정용액(b')의 해당 동위원소 비($R_{b'}$)를 이용하는 것이다.

[52] 본 발명의 황 동위원소 비(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)를 이용한 황이 함유된 유기화합물의 정량방법의 바람직한 일 실시예는

[53] (1) 황이 함유된 유기화합물을 포함하는 시료용액(x)을 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)으로 희석하여 이론적 동위원소 비(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)가 1이 되도록 시료혼합용액(b)을 제조하는 단계;

[54] (2) 상기 단계(1)과 동시에, 황 동위원소 비가 자연존재 비인 황 표준용액(z)과 상기 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)을 이론적 동위원소 비(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)가 0.2 내지 5의 값이 되도록 혼합하여 보정용액(b')을 제조하는 단계;

[55] (3) 상기(1)의 황이 함유된 유기화합물 내의 황을 무기물 형태인 황산화물(sulfate)로 분해 및 회수하는 단계; 및

[56] (4) 상기 단계(3)에서 회수된 시료혼합용액의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소 비와 상기 단계 (2)에서 제조된 보정용액의 해당 동위원소 비를 측정하는 단계;를 포함하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법이다.

[57] 본 발명의 정량방법은 황이 함유된 유기화합물은 제한 없이 정량하는 것이 가능하지만, 통상적인 화학저울, 질량분석기, 또는 다른 분석 장비를 이용하여 정량을 하는데 있어 편향의 가능성이 높은 흡습성이 강하거나 수화물 형태의 유기화합물 또는 생체물질들을 정량하는데 바람직하다. 상기 바람직한 생체물질은 펩티드, 단백질 또는 황이 포함되도록 변형된 DNA, RNA 또는 PNA 등이 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 펩티드와 단백질은 메티오닌, 시스테인 또는 둘 다를 포함하는 펩티드 또는 단백질인 것이다. 상기 단백질은 주로 탄소, 수소, 산소로 이루어져 있고, 낮은 비율의 황도 포함하고 있다. 이외에도 인과 같은 헤테로원자(heteroatom)를 포함하는 경우도 있으나 이는 특정 단백질에만 변형된 형태로 나타날 뿐이다. 상기 탄소, 수소 및 산소는 단백질의 조성 중 상대적 존재비가 높은 원소이지만, 공기나 측정에 사용하는 용매에도 존재하는 경우가 많아 바탕 신호의 제어가 어려울 수 있다. 따라서 존재비는 작으나 대부분의 단백질에 시스테인이나 메티오닌 형태로 존재하는 황 측정에 기반을 둔 단백질의 절대정량법이 바람직하다.

[58] 상기 단계(3)에서, 황이 함유된 유기화합물 내의 황을 무기물 형태인 황산화물(sulfate)로 분해하는 방법은 상기 시료혼합용액(b)에 전자파 조사와 산분해를 동시에 처리하여 상기 황이 함유된 유기화합물 내의 황을 원소 형태인 황산화물(sulfate)로 분해 하는 것으로, 보다 상세하게는 산 처리한 된 시료혼합용액(b)을 전자파 오븐에 넣어 10분 내지 240 분 동안 100 내지 300℃에서 유지하면서 산분해 하고, 추가로 반복하여 전자파 오븐 처리를 하는 것을 포함할 수 있다. 전자파조사와 산분해를 동시에 처리하는 것은 효과적으로 황을 무기원소 형태로 분해 할 수 있는 방법이지만, 이에 한정하지 않고 다양한 조건으로 황을 무기물 형태로 분해해도 무방하다. 또한, 상기 산분해에서 사용될

수 있는 산은 황산을 제외한 질산, 과염소산이 바람직하지만 이에 한정하지 않고, 산화력을 높이기 위해 과산화수소(H_2O_2)를 더 포함하는 조건으로 산분해를 실시할 수 있다.

[59] 분해하고자 하는 유기화합물의 탄소, 수소, 질소 및 황 원자의 총 몰수를 1로 기준하였을 때, 산화제의 몰 비가 적어도 10배 이상 되도록 사용하는 것이 바람직하다. 10배 미만 몰 비의 산화제를 첨가하는 경우, 산분해가 충분하게 일어나지 않을 수 있으며, 초과하는 경우에는 큰 문제는 없으나 최종 분석 용액의 산농도가 ICP/MS 분석에 적합한 10%를 넘지 않도록 하는 것이 좋다.

[60] 상기 단계(4)에서 획득된 시료혼합용액의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소 비와 보정용액의 해당 동위원소 비를 얻으면 황 함량으로 환산한 단백질 함량은 하기 <식 1>에 의해 계산될 수 있다.

[61] 하기 <식 1>에서 R_x와 R_z는 IUPAC에서 주어진 황의 자연존재비 0.042/0.9501($^{34}S/^{32}S$)를 사용하거나 동위원소 비 측정용 질량분석기를 이용하여 직접 측정한 값을 이용할 수 있다.

[62]

[63] <식 1>

[64]
$$C_x = \left\{ C_z \cdot \frac{m_z\, m_y}{w\, m_z\, m_y'} \cdot \frac{R_y - R_b}{R_b - R_x} \cdot \frac{R_{b'} - R_z}{R_y - R_{b'}} \cdot \frac{\sum_i R_{xi}}{\sum_i R_{zi}} \right\} - (C_{blank})$$

[65] C_x: 측정하고자 하는 시료용액(x)의 농도,

[66] m_x: 저울을 이용하여 채취한 시료 또는 시료용액(x)의 질량,

[67] m_y: 시료용액(x)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

[68] m_y': 보정용 황 표준용액(z)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

[69] C_z: 보정용 황 표준용액(z)의 농도

[70] R_x: 시료용액(x)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[71] R_y: ^{34}S 농축 내부표준용액(y)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[72] R_z: 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{34}S, ^{33}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[73] R_{xi}: 시료 또는 시료용액(x)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$, $^{36}S/^{32}S$)

[74] R_{zi}: 보정용 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$ 또는 $^{36}S/^{32}S$)

[75] R_b: 시료혼합용액의 황 동위원소 비율(^{34}S, ^{33}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의

동위원소/^{32}S 동위원소)

[76] R_b: 보정용액의 황 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

[77] w: 건조질량 보정인자

[78] C_{blank}: 바탕시료의 농도

[79]

[80] 시료 전처리 과정에서 첨가해 주는 시약, 용매 및 용기 내에 불순물 형태의 황이 존재 할 수 있으므로, 바탕시료를 준비하여 C_{blank}(바탕시료의 황 농도값)를 구하고 시료에서 측정한 황 농도로부터 C_{blank}를 빼 주어야 순수한 시료 중 황 농도를 구할 수 있다.

[81] 본 발명에서 사용되는 용매는 탈이온수, 탈이온수로 만든 묽은 산 용액 또는 완충용액이 바람직하며, 이들 내에 포함된 황의 양이 0.02 mg/kg이하 인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 10 ng/kg 이하의 황을 포함하는 것이다. 상기와 같이 결정된 시료 중 황 함량은 유기화합물의 분자식을 이용하여 유기화합물의 함량을 산출하는데 사용될 수 있다. 그러나, 상기와 같이 구한 시료 중 황 함량에는 분석대상 외에 황을 함유한 다른 불순물도 포함되어 있을 수 있기 때문에 황 함유 불순물을 정량하여 총 황 함량에서 빼 주어야 SI 단위계로의 측정 소급성(traceability)을 갖출 수 있다. 상기 황 함유 불순물의 측정방법은 단백질의 경우 CE-ICP/MS 또는 SEC-ICP/MS를 사용하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다. 아래 실시 예에서는 BioSep SEC-3000 칼럼(300 ×4.6mm)을 사용하고 50 mM 중탄산 암모늄(ammonium bicarbonate)을 용리액으로 1 ㎖/min 유속으로 흘려 UV 및 ICP/MS로 불순물을 정량하였다.

[82] 이하, 실시 예 및 비교 예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[83]

[84] **실시예 1: 황 원소 기반의 인성장호르몬 단백질의 정량(1차) 실시.**

[85] 유기화합물 내의 황을 무기물 형태로 완전 분해하여 황 함량을 측정하고 SEC-ICP/MS를 통해 황 함유 불순물을 평가하고, SI 소급성을 갖춘 황 함량 측정 기반 유기화합물 정량방법을 실시하였다. 인성장호르몬은 평균분자량 22,125 Da으로 3개의 메티오닌과 4개의 시스테인을 갖고 있어 분자 당 7개의 황 원자를 함유하고 있다. 따라서 1몰(mole)의 hGH은 7 mole의 황 원자에 해당한다.

[86] (1) 혼합용액 및 보정용액의 제조(도 1 및 도 2 참조)

[87] ① 인성장호르몬(hGH) 표준용액(1차 배치의 경우 황 함량으로 약 65 mg/kg 농도) 0.5g씩 5개 용기(vial)로부터 각각 5개의 테플론 계열 용기(TFM vessel)에 채취하였다.

[88] ② 채취한 시료에 32.5 mg/kg의 ^{34}S 농축 표준용액(Oak Ridge National Lab.)을 1

mL를 첨가하여 예상 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$)가 1의 시료혼합용액(sample blend)이 되도록 준비 (5개 sample blend)하였다.

[89] ③ 32.5 mg/kg의 sulfur 표준용액 1 mL와 위 ^{34}S 농축 표준용액 1 mL를 섞어주고 10 %(희석비) HNO_3로 30g으로 희석하여 역시 동위원소 비 1의 보정용액(calibration blend) 5개를 준비하였다.

[90] ④ Sample blend가 들어있는 테플론 계열 용기(TFM vessel)에 3 mL 질산, 3 mL 탈이온수, 2 mL의 과산화수소수를 첨가하였다.

[91] ⑤ 테플론 계열 용기(TFM vessel)를 밀봉하고 전자파 오븐에 넣어 15분간 200℃까지 가열하고, 20분간 200℃ 를 유지하여 전자파-보조된 산분해를 실시하였다.

[92] ⑥ 테플론 계열 용기(TFM vessel)가 어느 정도 냉각된 후 용기를 충분히 흔들어주어 용기 내부 용액을 균질화 하였다.

[93] ⑦ TFM 압력 용기를 해체하여 sample blend 용액을 회수하고 탈이온수를 사용하여 30 g으로 희석하였다.

[94] 한편, 최적 동위원소 비는 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$)가 1에 가까울수록 측정 편향이 최소화되므로(도 3 참조), 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$) 1을 동위원소희석의 목표 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$)로 하였다. 따라서 본 실시예 1에서는 상기와 같이 미국국립표준기술연구소(National Institute of Standards and Tchnology;NIST)에서 제조하여 시판하는 황 표준용액(SRM 3154)(z)을 희석한 작업용액과 ^{34}S 농축 내부표준용액(y)을 혼합하여 동위원소 비($^{34}S/^{32}S$)가 1이 되도록 보정용액(b') 을 제조하였다.(도 1 및 도 2 참조).

[95] (2) ICP/MS 측정

[96] ① Thermo사의 고분해능 ICP/MS를 고분해능(R>10,000)으로 최적화 하였다. (medium resolution도 산, 용매, 유기물 및 ICP 가스로부터 생성되는 이온 간섭을 제거하기에 충분하나 탈이온수와 사용한 산 및 기구에 존재하는 sulfur의 높은 바탕신호에 의한 영향을 최소화하기 위해 고분해능으로 기기 감도를 낮추어 측정): 준비된 시료혼합용액(sample blend; b)과 보정용액(Calibration blend, b')는 ^{32}S와 ^{34}S에 대해 약 60만-70만 cps의 신호세기를 나타내었다.

[97] ② ^{32}S와 ^{34}S를 빠른 속도로 sweeping하면서 동위원소 비 측정하였으며, ID-ICP/MS에 의한 동위원소 비 측정시 주기적으로 동위원소 비가 알려진 동위원소 비 표준시료의 동위원소 비를 같이 측정하여 mass bias correction 및 drift를 bracketing correction으로 보정하였다.

[98] ③ 측정된 동위원소 비를 이용하여 측정값을 산출하고 측정에 영향을 주는 각 인자에 대한 불확도 평가결과를 합성하여 측정 불확도를 추정하였다.

[99] (3) ID-ICP/MS에 의한 hGH 1차 배치 황 함량 측정 결과

[100] hGH 1차 배치는 제조사 제공 농도가 303 μmol/kg 이었으며, 아미노산 기반 정량을 통해 290 μmol/kg(황 함량으로 65 mg/kg) 임이 확인되었다.

[101] ① hGH 1차 배치의 황 함량 측정 결과는 표 1 및 도 4A에 기재하였다. 종래 방법인 아미노산 기반 정량 결과와 비교하면 5 % 정도 황 기반 정량 결과가 높게

측정되었다.(도 4B 참조)

[102] 표 1. 인성장호르몬 표준용액 1차 배치의 황(sulfur) 측정결과.

[103]

	No	results (mg/kg)	systematic u (mg/kg)	v
	1	68.75	0.24	78
	2	69.00	0.24	78
시료	3	68.67	0.24	78
	4	67.80	0.24	78
	5	68.59	0.24	78
Average		68.56		
u_{random} (std of the mean)		0.20		4
$u_{systematic\ pooled}$		0.24		78
$u_{combined}$		0.32		21
$U_{combined}$		0.66		

[104] ② 본 발명의 황 원소 기반 단백질 정량 결과가 종래의 아미노산 기반 결과에 비해 정량 값이 높은 이유를 확인하기 위하여, 우선 시료 중 황 원소를 포함한 작은 분자의 불순물이 존재하여 총 황 함량에 기여했을 가능성을 크기배제 크로마토그래피(SEC)-UV와 SEC-ICP/MS로 확인하였다.(도 5 및 도 6 참조)

[105] SEC-UV에서 4분 이후에 용출되는 작은 피크가 작은 분자에 해당하는 피크이며, SEC-ICP/MS에서 MS를 황 이온에 해당하는 m/z 32 및 34에 고정시켜두고 이온크로마토그램을 획득하여 해당 머무름 시간에 검출 가능한 피크가 없음을 확인하였다. 상기 결과는 황 포함 작은 분자 불순물이 총 황 함량 측정에 주는 영향이 0.5 % 미만이었다. 따라서 본 발명의 실시예 1에서의 황 포함 불순물에 의해 원소기반 단백질 정량 결과가 과대평가되었을 가능성은 없는 것으로 판단되었다.

[106] **실시예 2: 황 원소 기반의 인성장호르몬 단백질의 정량(2차 배치) 실시.**

[107] 상기 실시예 1에서 실시한 동일한 방법으로 새로 제조된 hGH 2차 배치에 대해서 인성장호르몬 단백질의 정량을 실시하였다. 시료의 농도가 1차 배치에 비해 1/3 정도로 낮게 제조되었기 때문에 분석용 시료 채취량을 0.5 g에서 1.0 g으로 늘리고 이에 맞추어 농축동위원소 용액의 농도를 조절하여 시료혼합용액과 보정용액의 동위원소 비를 기존과 마찬가지로 1에 가깝게 만들었다. 2차 제조된 hGH의 용기(vial)당 시료의 양이 1회 시료 채취량에 모자랐기 때문에 두 개 이상의 용기(vial)l에서 한 개의 분취시료를 채취하였다. 2차 배치의 분석결과는 도 7과 표 2에 기재하였다.

[108] 표 2. 인성장호르몬 표준용액 2차 배치의 황(sulfur) 측정결과.

[109]

	No	results (mg/kg)	systematic u (mg/kg)	v
시료	1	19.56	0.07	21
	2	22.53	0.07	21
	3	21.67	0.07	21
	4	19.60	0.07	21
Average		20.84		
u_{random} (std of the mean)		0.75		3
$u_{systematic\ pooled}$		0.07		21
$u_{combined}$		0.75		3
$U_{combined}$		2.40		

[110] **실시예 3. hGH T2, T11 펩티드에 대한 원소기반 절대정량 실시.**

[111] 황 원소기반 hGH 정량에서 이차에 걸쳐 동일한 측정 편향이 관찰됨에 따라 아미노산 기반 정량 결과가 가수분해의 효율 및 부반응에 의해 영향을 받았을 가능성을 검토해 보기 위해 가수분해가 좀 더 용이할 것으로 보이는 hGH의 T2 및 T11 펩티드 표준용액을 준비하여 아미노산 기반 정량 및 황 원소 기반 정량 결과를 비교해 보기로 하였다.

[112] 인성장호르몬의 N말단으로부터 두 번째 tryptic 펩티드인 T2 펩티드는 LFDNA MLR의 서열을 갖고 있어 황을 포함한 메티오닌이 한 개 존재하므로 펩티드 하나 당 황 원자 하나를 갖고 있어 황 원소 기반 정량이 가능하다.

[113] T11 펩티드도 DLEEGIQTLMGR와 같은 서열을 가져 역시 메티오닌이 한 개 포함되어 있으므로 펩티드 1 당량에 황 원자 1 당량이 함유되어 있다. T2의 농도는 1 mmol/kg 로 제조하였으며 제조사 제공 순도는 99.1 %이고, T11의 농도는 1 mmol/kg으로 만들었고 제조사 제공 순도는 99 %이다. 따라서 각각의 황 원소 예상 함량은 32 mg/kg이다.

[114] 도 8 및 표 3으로 기재된 바와 같이 황 원소 기반 펩티드 정량을 통해 T2 펩티드 함량을 확장 불확도 3.1 % 수준으로 측정할 수 있다. 그러나 T2 펩티드에 대한 황 원소 기반 정량결과도 단백질 정량과 마찬가지로 아미노산 기반 정량과 비교하여 10 % 수준의 측정 편향을 보여주고 있다. T11 펩티드는 함량을 0.84 %의 확장불확도로 정량할 수 있었으나 T2 펩티드와 유사한 측정 편향을 보이고 있다 (도 9 및 표 3참조). 따라서 아미노산 기반 정량을 위한 펩티드의 가수분해 시에도 가수분해의 불완전성 및 산분해의 이차반응에 의한 손실이 여전히 존재하거나 관찰된 측정 편향이 다른 요인에 의한 것일 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

[115] 표 3. 인성장호르몬 T2 펩티드 표준용액의 황(sulfur) 측정결과.

[116]

	No	results (mg/kg)	systematic u (mg/kg)	v
시료	1	22.44	0.07	118
	2	22.27	0.07	119
	3	22.78	0.07	117
	4	23.23	0.07	116
Average		22.68		
U_{random} (std of the mean)		0.21		3
$U_{systematic\ pooled}$		0.07		117
$u_{combined}$		0.22		3
$U_{combined}$		0.71		

[117] 표 4. 인성장호르몬 T11 펩티드 표준용액의 황(sulfur) 측정결과.

[118]

	No	results (mg/kg)	systematic u (mg/kg)	v
시료	1	22.44	0.07	118
	2	22.27	0.07	119
	3	22.78	0.07	117
	4	23.23	0.07	116
Average		22.68		
U_{random} (std of the mean)		0.21		3
$U_{systematic\ pooled}$		0.07		117
$u_{combined}$		0.22		3
$U_{combined}$		0.71		

[119] <u>실시예 4. 메티오닌에 대한 원소기반 절대정량 실시.</u>

[120] 단백질에 비해 작은 펩티드 표준용액에 대한 황 원소 기반 정량에서도 단백질 표준용액과 동일한 측정 편향이 관찰됨에 따라 황을 포함한 아미노산 표준용액(Met 및 Cys)을 제조하여 황 원소 기반 정량법으로 순도분석을 대체하고 아미노산 표준용액을 인증하고 활용하기로 하였다. 이렇게 제조 인증된 아미노산 표준용액은 LC-MS/MS를 이용하여 단백질 및 펩티드를 아미노산

기반으로 정량하는데 활용될 수 있다. 시스테인은 산화반응에 의해 이황화결합 형태로 쉽게 변할 수 있으므로 분석의 복잡성을 피하기 위해 먼저 메티오닌의 표준용액을 준비하고 이에 대한 원소기반 절대정량을 시도하였다. 메티오닌을 이용하여 아미노산 기반 정량 시 메티오닌도 산화 등이 쉽게 일어나므로 LC-MS/MS 분석 시 원형그대로의 메티오닌 뿐 아니라 산화된 메티오닌도 함께 분석할 필요가 있다.

[121] 제조된 메티오닌 표준용액의 농도는 1 mmol/kg이고 제조사 제공 순도는 99.5 % 이상이었다. 이는 황 함량 32 mg/kg에 해당한다. 메티오닌 표준용액의 황 원소기반 정량 결과는 도 10 및 표 5와 같으며 확장불확도 1 % 이내의 정량 결과를 얻을 수 있었다. 이렇게 제조된 메티오닌 표준용액은 향후 hGH은 물론 hGH의 T2, T11 펩티드와 메티오닌을 포함한 단백질의 아미노산 기반 정량에 활용할 수 있다.

[122] 표 5. 메티오닌 표준용액의 황 원소 기반 정량분석 결과.

[123]

	No	results (mg/kg)	systematic u (mg/kg)	ν
시료	1	31.99	0.10	348
	2	31.95	0.10	349
	3	32.07	0.10	346
	4	31.97	0.10	348
	5	32.46	0.10	338
Average		32.09		
u_{random} (std of the mean)		0.10		4
$u_{systematic\ pooled}$		0.10		345
$u_{combined}$		0.14		15
$U_{combined}$		0.29		

[124] <u>실시예 5. 기존 시료 전처리 (전자파조사를 통한 산분해) 방법 및 소량 시료 전처리 방법의 유효성 검토.</u>

[125] 유기화합물 내의 황을 무기물 형태로 완전 분해하여 내부표준용액으로 첨가한 농축동위원소와 충분한 화학적 평형을 위하여 전자파조사와 산분해를 동시에 처리한다. 실시예 1부터 4까지의 실험에 사용된 전자파조사를 통한 산분해 방법은 시료를 100 mL 용량의 밀폐된 테플론 계열 용기 (Teflon vessel)에 채취하여 전자파 오븐에 넣어 15분간 200℃ 까지 가열하고, 20분간 200℃ 를 유지하여 전자파-보조된 산분해를 실시하는 것이다. 사용된 시료 전처리 방법의

유효성 검토를 NIST SRM 2389a (일반적 유기화합물 순도분석에 의해 인증된 아미노산 혼합물 인증표준물질) 시료 내의 황 함량을 측정하여 인증값과 비교함으로서 하고자 하였다. 시료 0.2 g을 테플론 계열 용기에 취하고 농축동위원소 ^{34}S(ORNL)을 미리 계산된 농도로 희석하여 vessel에 첨가한 후, 65 % 질산 3mL, 탈이온수 3 mL, 30 % 과산화수소수 2 mL를 첨가하고 산분해를 수행하였다. 또한 소량 시료 산분해를 위한 전처리 방법에 대해서도 NIST SRM 2389a 시료를 분석함으로서 유효성 검토를 실시하였다. 시료 0.2 g을 소량 시료 전용 테플론 용기에 취하고 농축동위원소 ^{34}S(ORNL)을 미리 계산된 농도로 희석하여 vessel에 첨가한 후, 65 % 질산 3 mL를 첨가하고 전자파 오븐에 넣어 8분 동안 120 ℃까지 올린 다음, 7분 동안 220 ℃까지 올린 후 220℃에서 20분간 유지하여 전자파-보조된 산분해를 수행하였다. NIST SRM2 389a시료는 아미노산 표준용액으로 메티오닌이 (0.3733 ±0.0108) mg/kg, 시스테인이 (0.2954 ±0.0133) mg/kg 함유되어 있다. 메티오닌은 황 원자 하나를 시스테인은 황 원자 2개를 가지고 있으므로 NIST SRM 2389a 시료가 함유하고 있는 황 함량은 (158.4 ±4.2) mg/kg이다. NIST SRM 2389a시료의 황 함량 측정 결과는 표 6 및 도 11에 기재하였다. 실시예 1부터 4에 사용된 시료 전처리 방법으로 산분해한 시료와 소량 시료 전처리 방법으로 산분해한 시료 모두 측정한 황 함량값이 NIST SRM 2389a의 인증값과 불확도 범위내에서 일치함을 확인할 수 있다.

[126] 표 6. 아미노산 표준용액 NIST SRM2389a의 황 측정결과.

[127]

NIST SRM2389a	Value, mg/kg	Expanded uncertainty, mg/kg
Certified value	158.4	4.2
Large Vessel MW Digestion	158.0	1.8
Small Vessel MW Digestion1	157.7	1.2
Small Vessel MW Digestion2	156.7	1.7

[128] **실시예 6. 황 원소 기반의 인성장호르몬 단백질의 인증 (2차 배치) 실시.**

[129] 새로 제조된 hGH 2차 배치에 대해서 인성장호르몬 단백질 인증을 실시하였다.

[130] (1) 혼합용액 및 보정용액의 제조

[131] ① 동위원소희석 질량분석법의 적용을 위해 농축동위원소 ^{34}S 농축 표준용액(Oak Ridge National Lab.)을 계산된 농도 3.99 mg/kg로 희석하여 준비하였다. 이를 11개의 teflon vessel(시료혼합용액: sample blend solution)과 LDPE bottle 4개(보정용혼합용액: calibration blend solution)에 1 g씩 첨가하였다. 농축동위원소용액 첨가 시 먼저 2개의 보정용혼합용액용 bottle에 첨가하고 11개의 시료혼합용액용 vessel에 첨가한 다음 마지막으로 남은 2개의 보정용혼합용액 bottle에 첨가하였다. 이때 ^{34}S 농축 표준용액(Oak Ridge National Lab.)을 첨가하여 측정 예상 동위원소비($^{34}S/^{32}S$)가 1의 sample blend가 되도록 준비하였다.

[132] ② hGH 표준용액 11개의 vial로부터 각각 0.2 g 씩 농축동위원소용액이 첨가되어 있는 microwave digestion teflon vessel 11개에 각각 채취하였다. (11개 sample blend)

[133] ③ 보정용혼합용액에 사용할 황 표준용액 (NIST SRM 3154)을 4.12 mg/kg로 희석하여 준비한 후 ^{34}S 농축 표준용액 1 g이 들어있는 ①에서 제조한 LDPE bottle 4개에 1 g 씩 넣어 섞어주었다. 이를 5% 질산을 이용해 30 g으로 희석하여 예상 동위원소비 1이 되게 보정용혼합용액 4개를 준비하였다.

[134] ④ Sample blend가 들어있는 vessel에 65 % sub-boiled 질산 3 mL를 첨가한다.

[135] ⑤ TFM vessel의 뚜껑을 닫고 Milestone사의 UltraWAVE Microwave Digestion System에서 8분 동안 120 °C까지 가열하여 올린 다음, 7분 동안 220 °C까지 올린 후 220 °C에서 20분간 유지하여 MW-assisted 산분해를 수행하였다.

[136] ⑥ 산분해 후 vessel이 어느 정도 냉각된 후 sample blend 용액을 회수하고 30 g으로 희석하였다.

[137] (2) ICP/MS 측정

[138] ① Agilent사의 8800 ICP-Triple Quad (ICP-QQQ)를 O_2 mode로 최적화하였다. (^{32}S와 ^{34}S에 대해서 quadrupole 1에서 m/z=32, 34를 filtering하고 O_2 gas와 reaction 후 quadrupole 2에서 $^{32}S^{16}O^+$와 $^{34}S^{16}O^+$인 m/z = 48, 50을 filtering하여 detection함.)

[139] ② 회수한 시료에 20 mL의 5 %질산을 첨가하여(17배 희석함) 동위원소비를 측정하였다. (^{32}S와 ^{34}S에 대해서 각각 약 25만 count정도 signal intensity보임) 동위원소 비 측정시 주기적으로 동위원소 비가 알려진 동위원소 비 표준시료의 동위원소 비를 같이 측정하여 mass bias correction 및 drift를 bracketing correction으로 보정하였다.

[140] ③ 시료는 각각 3회 반복 측정하였으며, 측정된 동위원소비를 이용하여 측정값을 산출하고 측정에 영향을 주는 각 인자에 대한 불확도 평가결과를 합성하여 측정 불확도를 추정하였다.

[141] (3) ID-ICP/MS에 의한 hGH 2차 배치 황 함량 인증 결과

[142] hGH 2차 배치는 제조사 제공 농도가 2 mg/mL 이었으며, 아미노산 기반 정량값은 1.8 mg/mL로 황 함량으로 18.2 mg/kg에 해당한다.

[143] ① hGH 2차 배치의 황 함량 측정 결과의 기준값은 11개 vial에서 채취한 시료의 측정결과의 평균값이며 균질도는 11개 시료의 각각에 대한 측정값의 표준편차로부터 추정하였다. 측정불확도는 11개 시료로부터 구한 평균값의 표준편차와 시료 측정시 계통효과에 의한 불확도를 주로 포함하는 합동표준편차(pooled standard deviation) 값으로부터 합성표준불확도(combined standard uncertainty)와 유효자유도(degree of freedom)을 계산하였으며, 이로부터 포함인자(coverage factor)를 구하고 확장불확도(expanded uncertainty)를 구하였다. 각 병에 대한 측정값의 표준편차는 표 7 및 도 12에 도시된 바와 같이 평균값의 0.98 %로 병간 균질도가 매우 좋음을 알 수 있다. 이내로 인증표준물질에 사용하기 적합한 균질성을 보임을 알 수 있다. 2차 배치 hGH 중

S 함량 인증값과 확장 불확도는 표 7에 표시된 바와 같이 (18.88 ±0.75) mg/kg 이다. 아미노산 및 펩타이드 기반 정량 결과와 비교하면 불확도 범위내에서 인증값이 잘 일치함을 확인할 수 있다. (도 13 참조)

[144] 표 7. 인성장호르몬 표준용액 2차 배치의 황(sulfur) 측정기반 인증결과.

[145]

	No	Analytical results (mg/kg)	Standard uncertainty due to the systematic effects (mg/kg)	Degree of freedom (?)
Sample	1	18.92	0.24	3
	2	18.90	0.24	3
	3	18.77	0.24	3
	4	18.70	0.24	3
	5	18.87	0.24	3
	6	19.08	0.24	3
	7	18.55	0.24	3
	8	19.25	0.24	3
	9	18.88	0.24	3
	10	18.88	0.24	3
	11	18.91	0.24	3
Pooled standard deviation and degree of freedom due to the systematic effects			0.24	3
Mean		18.88		
Standard deviation		0.18		10
Relative standard deviation		0.98 %		
Certified value			**18.88**	
Combined standard uncertainty (u_c)			0.30	
Degree of freedom			6	
Coverage factor (k)			2.45	
Expanded Uncertainty (U) at 95 % level of confidence			**0.75**	
Relative Exp. Uncertainty			3.95 %	

청구범위

[청구항 1] 황 동위원소 비를 이용한 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
하기 단계 (1) 내지 (4)를 포함하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.
(1) 황이 함유된 유기화합물을 포함하는 시료용액을 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액으로 희석하여 자연존재비가 가장 큰 기준 동위원소(^{32}S)와의 이론적 동위원소 비가 0.2 내지 5의 값이 되도록 시료혼합용액을 제조하는 단계;
(2) ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 상기 내부표준용액과 자연존재비를 갖는 황 표준용액을 혼합하여 이론적 동위원소 비가 상기 단계 (1)에서 제조된 시료혼합용액과 유사한 값이 되도록 보정용액을 제조하는 단계;
(3) 상기 단계 (1)에서 제조된 혼합용액에서 황이 함유된 유기화합물을 분해하여 무기물 형태의 황산화물(sulfate)을 회수하는 단계; 및
(4) 상기 단계 (3)에서 회수된 황산화물의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소와 ^{32}S의 동위원소 비를 측정하고, 상기 단계 (2)에서 제조된 보정용액의 해당 동위원소 비를 측정하는 단계.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 황이 함유된 유기화합물은 메티오닌, 시스테인 또는 둘 다를 포함하는 단백질 또는 펩티드인 것을 특징으로 하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 단계 (3)에서, 황이 함유된 유기화합물을 포함하는 혼합용액에 전자파 조사와 산분해를 동시에 처리하여 무기물 형태의 황산화물로 분해하는 것을 특징으로 하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

[청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 전자파 조사 및 산분해를 동시에 처리하는 것은 황이 함유된 유기화합물에 산화제를 첨가한 후, 100 내지 300℃ 온도 조건에서 전자파를 조사하면서 산분해하는 것을 특징으로 하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 산화제는 질산, 과염소산, 과산화수소수 또는 이들의

혼합물인 것을 특징으로 하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

[청구항 7] 제1항에 있어서,

상기 단계(4)에서 획득된 혼합용액의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소 비 및 보정용액의 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소 비를 하기 <식 1>에 적용하는 것을 특징으로 하는 황이 함유된 유기화합물의 정량방법.

<식 1>

$$C_x = \left\{ C_z \cdot \frac{m_z\, m_y}{w\, m_x\, m_y'} \cdot \frac{R_y - R_b}{R_b - R_x} \cdot \frac{R_{b'} - R_z}{R_y - R_{b'}} \cdot \frac{\sum_i R_{xi}}{\sum_i R_{zi}} \right\} - (C_{blank})$$

C_x: 측정하고자 하는 시료용액(x)의 농도,

m_x: 저울을 이용하여 측정된 시료용액(x)의 질량,

m_y: 시료용액(x)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

m_y': 보정용 황 표준용액(z)에 첨가된 ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소가 농축된 내부표준용액(y)의 질량

C_z: 보정용 황 표준용액(z)의 농도

R_x: 시료용액(x)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

R_y: ^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에선 선택된 동위원소 농축 내부표준용액(y)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

R_z: 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

R_{xi}: 시료용액(x)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$, $^{36}S/^{32}S$)

R_{zi}: 보정용 황 표준용액(z)에 존재하는 황의 i번째 동위원소 비율 ($^{32}S/^{32}S$, $^{33}S/^{32}S$, $^{34}S/^{32}S$ 또는 $^{36}S/^{32}S$)

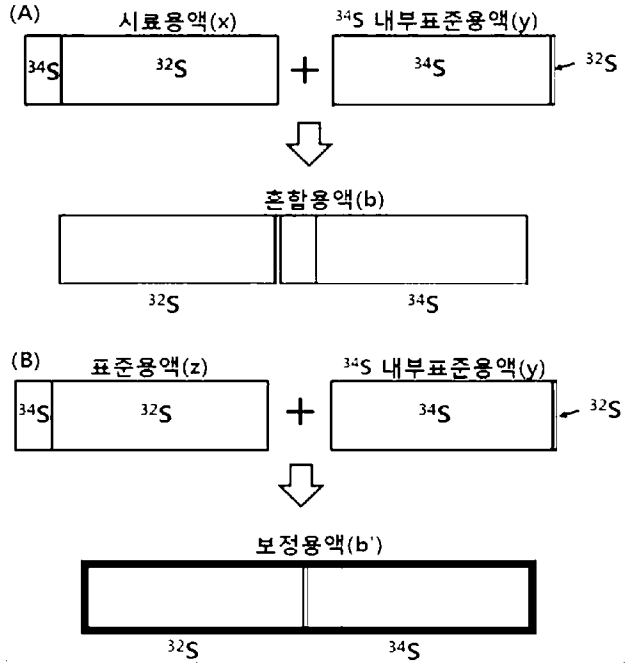
R_b: 시료혼합용액의 황 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

$R_{b'}$: 보정용액의 황 동위원소 비율(^{33}S, ^{34}S 및 ^{36}S 중 중에서 선택된 어느 하나의 동위원소/^{32}S 동위원소)

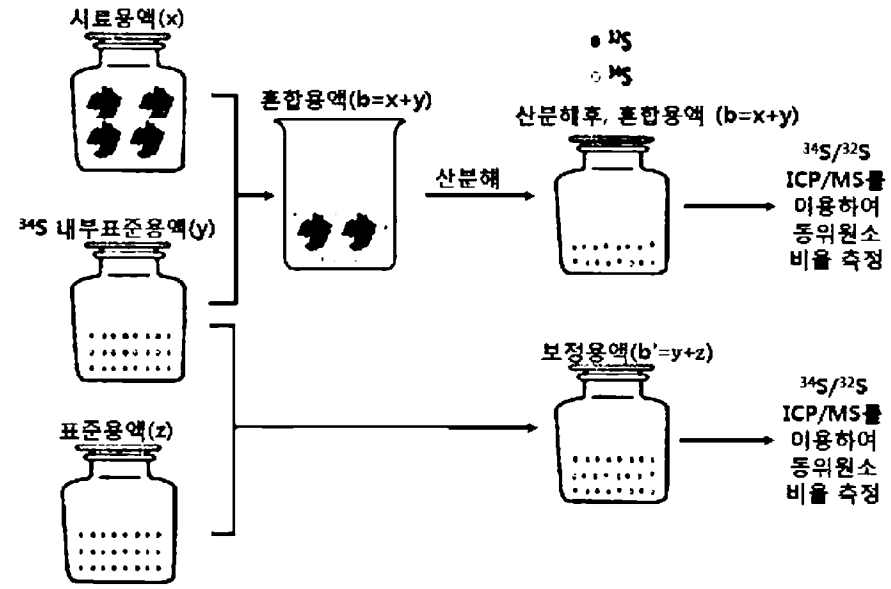
w: 건조질량 보정인자

C_{blank}: 바탕시료의 농도

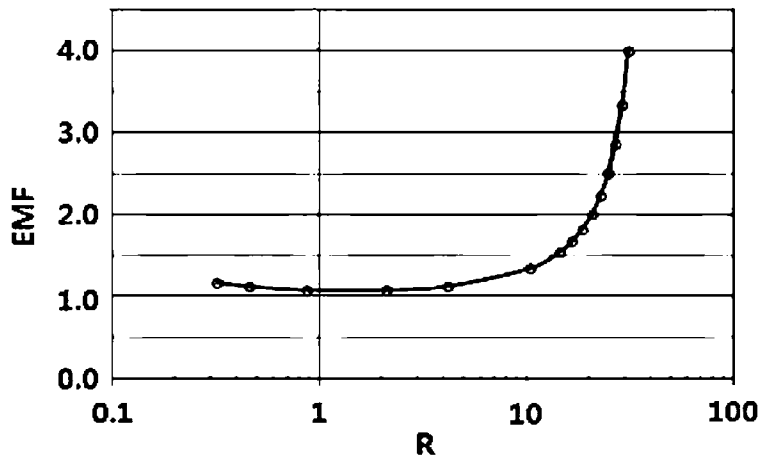
[Fig. 1]



[Fig. 2]

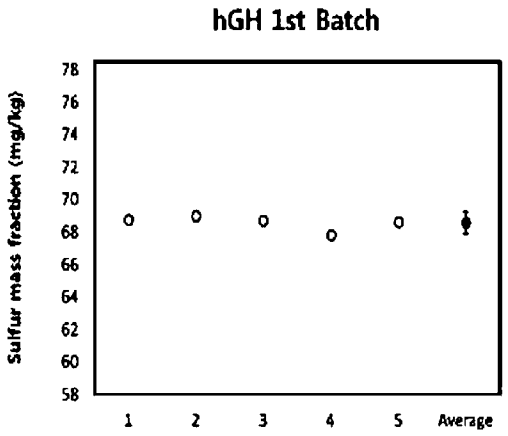


[Fig. 3]

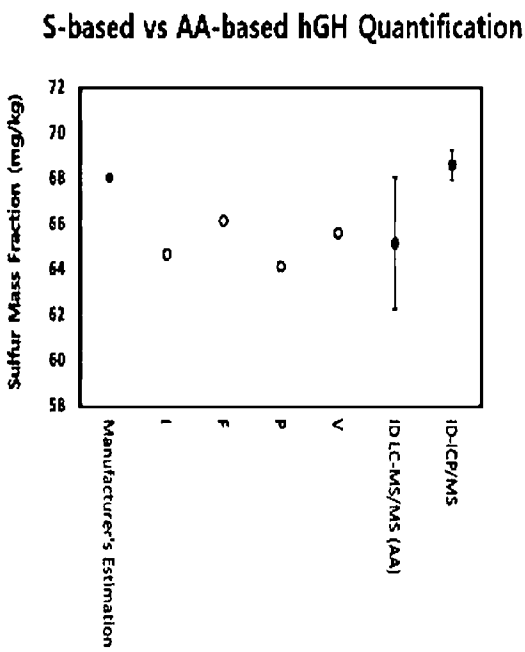


[Fig. 4]

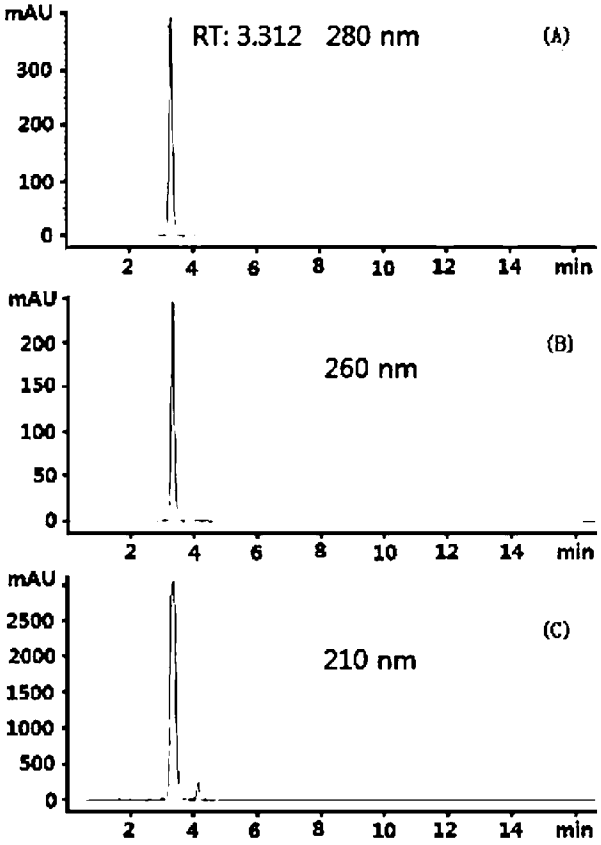
(A)


hGH 1st Batch
Sulfur mass fraction (mg/kg)
78
76
74
72
70
68
66
64
62
60
58
1
2
3
4
5
Average

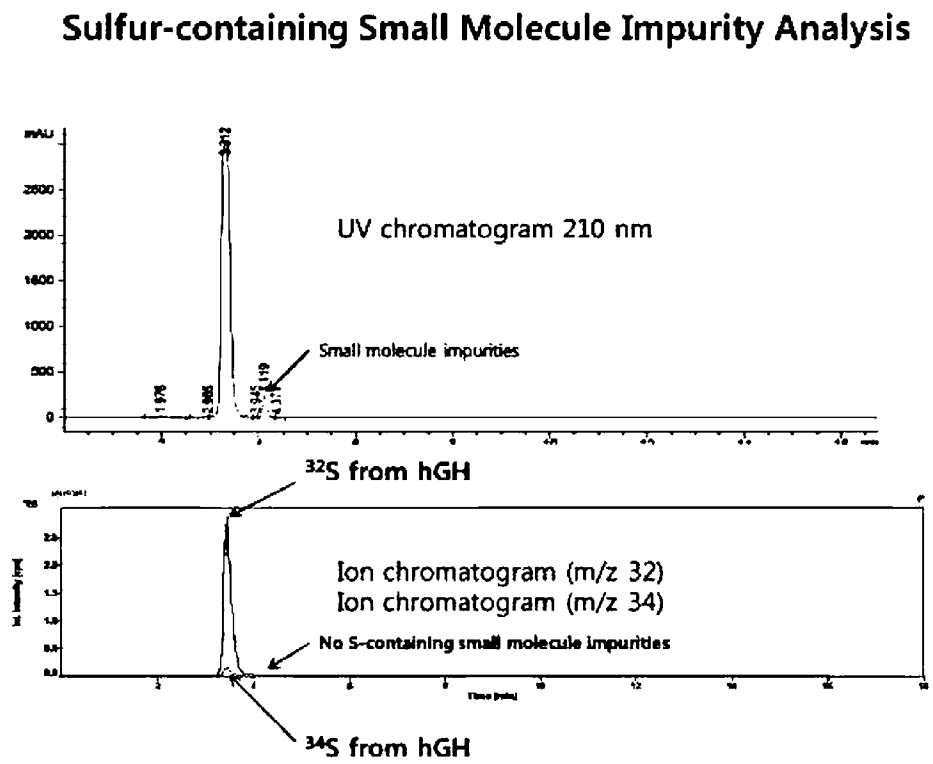
(B)


S-based vs AA-based hGH Quantification
Sulfur Mass Fraction (mg/kg)
72
70
68
66
64
62
60
58
Manufacturer's Estimation
I
F
P
V
ID LC-MS/MS (AA)
ID-ICP/MS

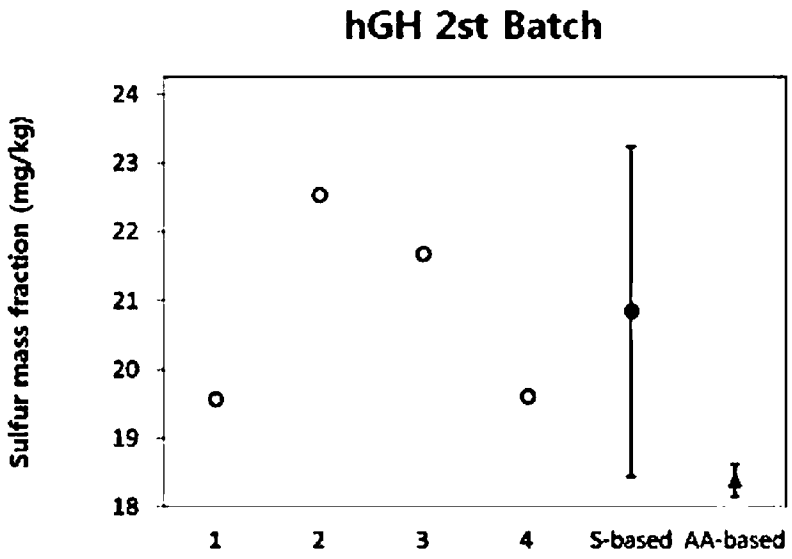
[Fig. 5]


mAU
RT: 3.312 280 nm
(A)
300
200
100
0
2 4 6 8 10 12 14 min
mAU
200
150
100
50
0
260 nm
(B)
2 4 6 8 10 12 14 min
mAU
2500
2000
1500
1000
500
0
210 nm
(C)
2 4 6 8 10 12 14 min

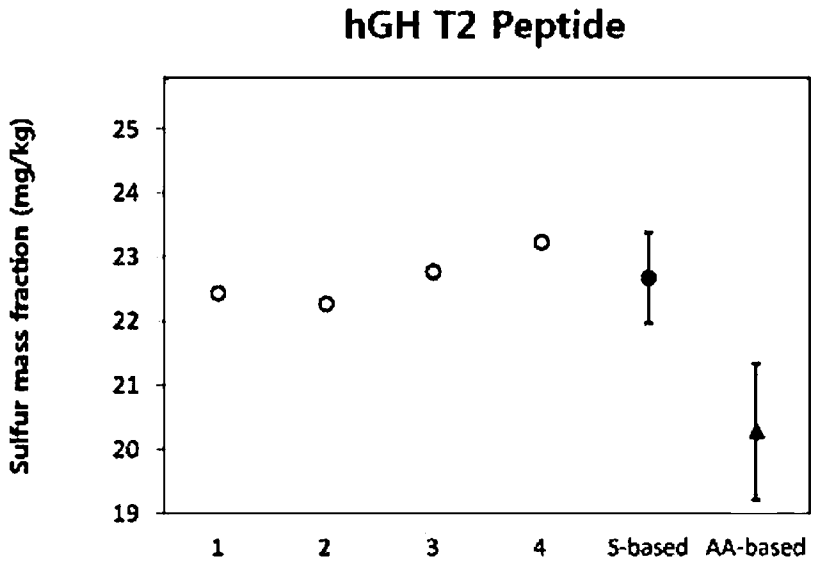
[Fig. 6]


Sulfur-containing Small Molecule Impurity Analysis
UV chromatogram 210 nm
Small molecule impurities
32S from hGH
Ion chromatogram (m/z 32)
Ion chromatogram (m/z 34)
No S-containing small molecule impurities
34S from hGH

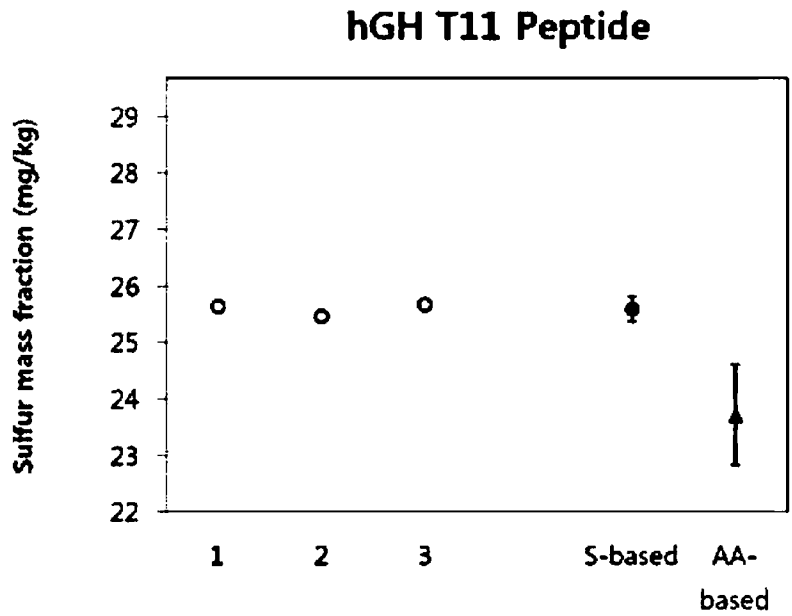
[Fig. 7]



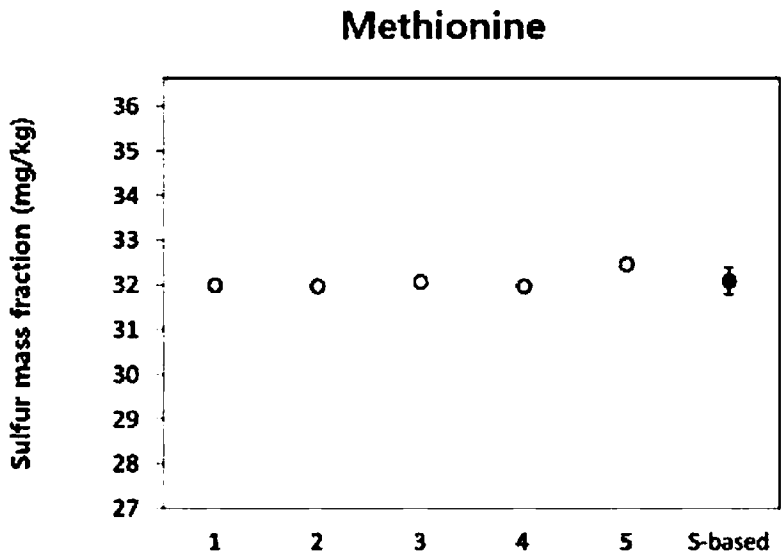
[Fig. 8]



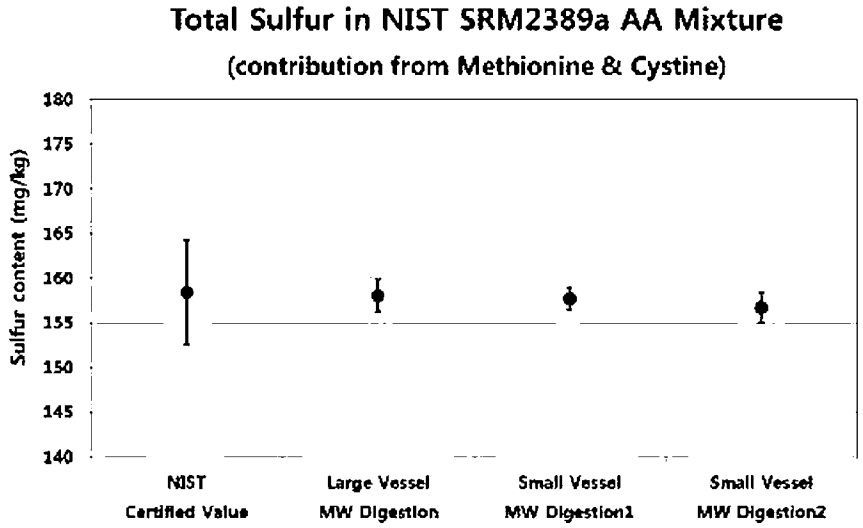
[Fig. 9]



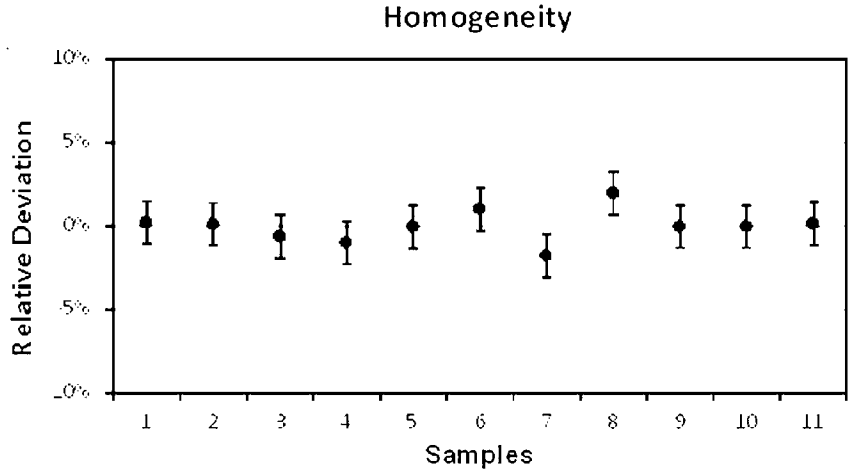
[Fig. 10]



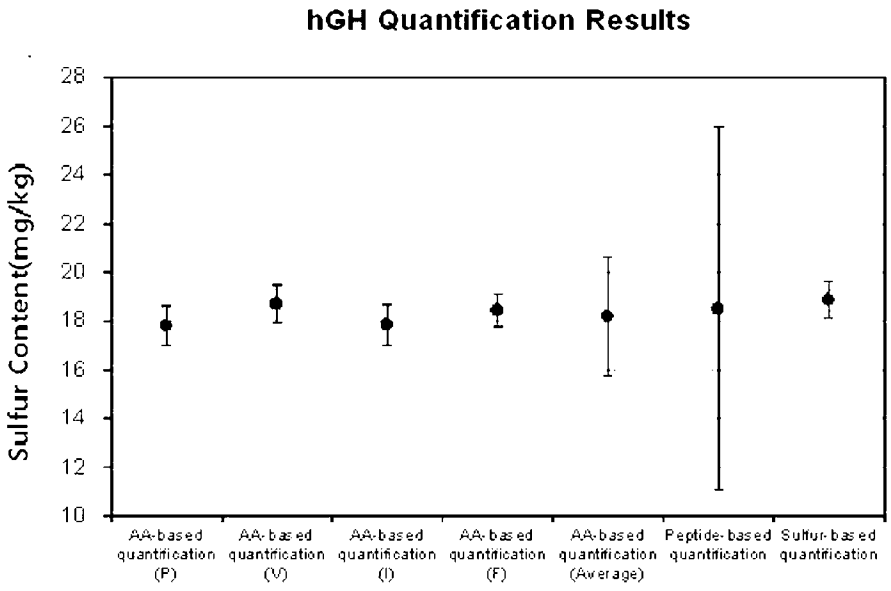
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]


hGH Quantification Results
Sulfur Content(mg/kg)
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
AA-based quantification (P)
AA-based quantification (V)
AA-based quantification (I)
AA-based quantification (F)
AA-based quantification (Average)
Peptide-based quantification
Sulfur-based quantification

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2013/011971

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C01B 17/00(2006.01)i, C01B 17/027(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)

C01B 17/00; C01B 17/027

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: sulfur, isotope, organic compound, constant volume

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Nico Jehmlich et al., "Sulfur-36S stable isotope labeling of amino acids for quantification (SULAQ)", Proteomics, vol. 12, pp. 37-42 16 December 2011 See abstract	1,3
X	M. H. Schroth et al., "In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses", Journal of Contaminant Hydrology, vol. 51, pp. 179-195 31 October 2001 See abstract, Material and methods	1
A	T. Barrelet et al., "Quantification of sulphur in Picea abies by LA-ICPMS", Proceedings of the DENDROSYMPOSIUM, vol. 53, pp. 130-137 24 April 2004 See the entire document	1-7
A	Jana Seifert et al., "PROTEIN-BASED STABLE ISOTOPE PROBING (PROTEIN-SIP) IN FUNCTIONAL METAPROTEOMICS", Mass Spectrometry Reviews, vol. 31, pp. 683-697 15 March 2012 See the entire document	1-7

☐ 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	Date of mailing of the international search report
25 FEBRUARY 2014 (25.04.2014)	**26 FEBRUARY 2014 (26.04.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2013/011971

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2013/011971

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C01B 17/00(2006.01)i, C01B 17/027(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C01B 17/00; C01B 17/027

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:황, 동위원소, 유기화합물, 정량

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	Nico Jehmlich et al., "Sulfur-36S stable isotope labeling of amino acids for quantification (SULAQ)", Proteomics, Vol.12, pp.37-42 2011.12.16. 요약 참조	1,3
X	M.H. Schroth et al., "In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses", Journal of Contaminant Hydrology, Vol.51, pp.179-195 2001.10.31. Abstract, Material and methods 참조	1
A	T. Barrelet et al., "Quantification of sulphur in Picea abies by LA-ICPMS", Proceedings of the DENDROSYMPOSIUM, Vol.53, pp.130-137 2004.04.24. 문헌 전체 참조	1-7
A	Jana Seifert et al., "PROTEIN-BASED STABLE ISOTOPE PROBING (PROTEIN-SIP) IN FUNCTIONAL METAPROTEOMICS", Mass Spectrometry Reviews, Vol.31, pp.683-697 2012.03.15. 문헌 전체 참조	1-7

☐ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 02월 25일 (25.02.2014)	2014년 02월 26일 (26.02.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
박함용
전화번호 +82-42-481-8409

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/011971

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음