(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0013362
(43) 공개일자 2017년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08G 12/14 (2006.01) *C08G 59/40* (2006.01)
G01N 1/34 (2006.01) *G01N 1/38* (2006.01)
G01N 27/62 (2006.01) *G01N 33/44* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08G 12/14 (2013.01)
C08G 59/4021 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0006318(분할)
(22) 출원일자 2017년01월13일
심사청구일자 2017년01월13일
(62) 원출원 특허 10-2015-0106012
원출원일자 2015년07월27일
심사청구일자 2015년07월27일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
오한빈
서울특별시 구로구 경인로 619-3 신도림3차푸르지오아파트 908호
문봉진
경기도 고양시 일산동구 강송로 196 강촌마을1단지아파트 108동 1202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

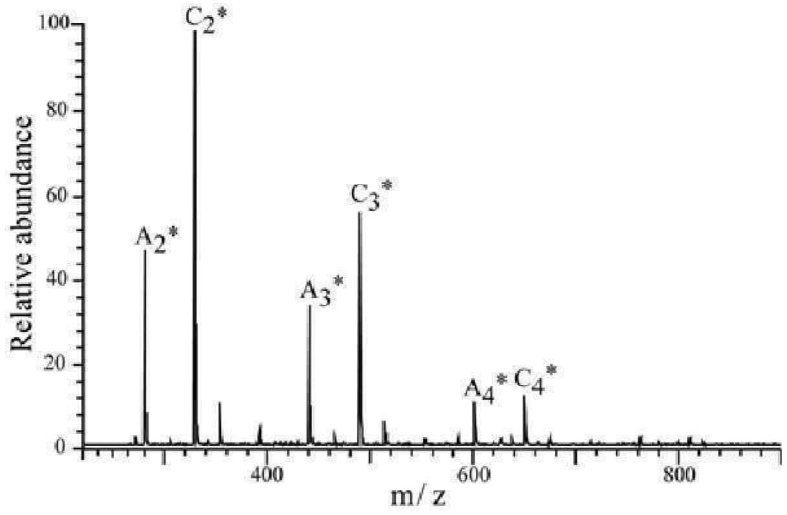
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **MALDI-TOF 질량분석방법을 이용한 고분자내 올리고머의 정량분석 방법**

(57) 요 약

본 발명은 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체를 제공하며, 생활용품 내에 포함된 구아니딘계 중합체내의 PGH(Oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-Guanidinium Chloride), PHMG (Polyhexamethylene Guanidine) 올리고머 및 PHMB(Polyhexamethylene Biguanide) 올리고머 함유량을 MALDI-TOF 질량분석법에 기반하여 정량분석하는 방법에 대한 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
G01N 1/34 (2013.01)
G01N 1/38 (2013.01)
G01N 27/62 (2013.01)
G01N 27/622 (2013.01)
G01N 33/442 (2013.01)
(72) 발명자
박명준
서울특별시 관악구 난곡로11가길 24 B동 B02호
배정은
경상남도 김해시 김해대로 1864 부영아파트 610동 704호
이정민
전라북도 익산시 서동로30길 34 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 10050221
부처명 산업통상자원부
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 제품안전기술기반조성사업
연구과제명 PHMG, PHMB, PGH의 함량 분석방법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 서강대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

구아니딘 그룹 내 세 개의 질소와 연결된 탄소가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체를 포함하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 내부 표준물질(internal standard)용 조성물.

청구항 2

제1항의 내부 표준물질용 조성물을 이용하여 질량 분석(Mass spectrometry) 방법을 통해 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 질량 분석(Mass spectrometry) 방법은 MAlDI-TOF 질량분석법을 이용하는 것을 특징으로 하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 4

a) 생활용품로부터 구아니딘계 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계;

b) 상기 추출한 샘플용액에 제1항의 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MALDI-TOF(matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및

c) 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 구아니딘계 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석하는 단계;를 포함하는 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 a)단계와 b) 단계 사이에 a-1) 단계로서, 상기 샘플용액을 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extracton, SPE)를 이용하여 샘플을 정제하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extracton, SPE)는 혼합모드 양이온 교환 (Mixed-mode Cation Exchange: MCX) 카트리지를 이용하는 것을 특징으로 하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 b) 단계에서의 질량분석 스펙트럼은 상대농도를 변화시켜 얻어진 시료와 이온성 액체를 혼합하여, 이온성 액체 매트릭스를 이용하여 얻는 것을 특징으로 하는, 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 생활용품은 물티슈, 콘택트 렌즈 세정액, 화장 제거제, 손 세정액, 살균제, 탈취제, 방향제로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 9

구아니딘 그룹 내 세 개의 질소와 연결된 탄소가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체를 포함하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 내부 표준물질(internal standard)용 조성물; 및 생활용품로부터 추출된, 구아니딘계 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액;을 포함하는, 생활용품내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 MALDI-TOF 질량 분석용 시료 조성물.

청구항 10

검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법으로서,

a) 검출대상으로부터 고분자 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계;

b) 상기 추출한 샘플용액에 방사선 동위원소로 표지된 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MALDI-TOF(matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및

c) 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 고분자 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석하는 단계;를 포함하는 검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 내부표준물질용 조성물은 표준물질의 분자내의 탄소원자 또는 질소원자가 방사선 동위원소로 표지된 것을 특징으로 하는, 검출대상내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 b) 단계에서의 질량분석 스펙트럼은 상대농도를 변화시켜 얻어진 시료와 이온성 액체를 혼합하여, 이온성 액체 매트릭스를 이용하여 얻는 것을 특징으로 하는, 검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 MALDI-TOF 질량분석방법을 이용한 고분자내 올리고머의 정량분석 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 방사선 동위원소를 포함하는 표준물질을 이용하여 MALDI-TOF 질량분석방법을 이용한 고분자내 올리고머의 정량분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] PGH (oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyeth-yl)-guanidinium-chlorid), PHMG (Polyhexamethyleneguanidinephosphate), PHMB (Polyhexamethylene Biguanide) 등의 구아니딘계 살균제는 뛰어난 살균력을 갖고 있어, 항감염, 항균제로 다양하게 사용되어 왔다. 반면에 이들은 생분해성이 아니므로 환경오염이 우려되며, 수생 독성이 심각할 수 있어 10 μg/L (0.000001%, 0.054 μM, 0.01 ppm)에서도 매우 높은 독성을 가지는 등의 여러 문

제점이 보고되고 있고, 또한 흡입 독성이 있어 스프레이로 사용 금지되어 있으나, 규제 없이 자의적, 무차별적으로 응용되어 제품으로 제조되어 사용된다면 매우 위험할 수 있다.

[0003] 그 중에서도 특히 PGH(Oligo-[2-(2-ethoxy)- ethoxyethyl]-Guanidinium Chloride)와 PHMG (Polyhexamethylene Guanidine)는 우리나라에서 가습기 살균제로 사용되다가, 2011년 수십 명이 사망하는 사건이 일어나 유독물로 지정되었다.

[0004] 상기 성분들은 인지질 이중막을 파괴하여 살균효과를 보이므로 사람에게도 세포 인지질 파괴 가능성이 있으며, 피부 장벽 파괴 우려가 있다. 따라서 물티슈처럼 피부에 자주 사용한다면 피부염을 유발할 수 있는 가능성이 존재하나, 여전히 소독제, 방부제, 탈취제, 물티슈 등의 생활환경 제품에 자의적으로 광범위하게 사용될 수 있어, 이들 성분들의 오남용을 막기 위해서 이들 성분, 특히 이들의 올리고머 성분의 간편하면서도 정량적인 검출방법의 개발에 대한 필요성이 요구되고 있다.

[0005] 이와 관련, 종래의 기술로 한국등록특허 제10-1503638호(2015.03.17.)에서는 살균제(PGH, PHMG 및 PHMB) 성분과 반응하여 발색 반응을 일으키는 시약을 제조하여 특정 제품에서 이들 성분들의 존재 유무를 검출하는 방법을 이용한, 생활환경제품에서 유해 살균제 성분의 검출 방법 및 검출키트에 관해 기재되어 있다. 그러나 상기의 선행문헌은 PGH, PHMG 및 PHMB의 존재 여부에 대한 정성적 검출만이 가능한 뿐, 정량적 분석을 할 수 없는 문제점이 있다.

[0006] 한편, 고분자 물질의 분석방법으로서, MAlDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight: 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화법) 질량분석법이 이용되고 있다.

[0007] MAlDI-TOF 질량분석기는 시료판 위에 분석하고자 하는 시료와 과량의 매트릭스를 섞어 올린 후, 시료/매트릭스 혼합물을 말려 결정구조를 만들고, 상기 시료판을 진공의 질량분석기에 넣은 후, 상기 시료판 위의 시료에 자외선 혹은 적외선 레이저를 조사하여, 시료를 이온화 또는 기체화시켜 비행시간 측정 진공 측정 장치로 날리고, 진공 내에서 검출기까지의 비행시간을 측정하여 질량을 측정하는 기기이다. 일반적으로 가벼운 분자는 빨리 날아가 빠른 검출 시간에서 검출되고, 무거운 분자는 느리게 날라고 느린 검출 시간에 검출되는 원리를 이용하여 시료의 질량을 측정할 수 있다.

[0008] 이러한 MAlDI-TOF 질량분석기를 이용한 분석방법으로서, 일본등록특허 제4141834호(2008.08.27.)에서는 매트릭스 지원 레이저 이탈 이온화 질량분석법을 사용한 높은 처리량인 단백질의 동정 및 정량을 위한 동위체 코드 이온화 증강 시약(ICIER)에 관한 기술로서, 단백질의 MAlDI-MS분석에 유용한 아르기닌 함유 시스테인 수식 화합물을 이용하여, 추가의 시료 조작 없이 MAlDI-MS의 이온화 증강, 상대적 정량 및 부가적인 데이터베이스 검색 조건을 동시에 제공하는 방법에 관해 기재되어 있으나, 이는 분석을 위해 내부표준물질을 2가지 시약으로 제조하여 단백질을 표지해야하는 문제점이 있다.

[0009] 따라서 생활용품 내 포함된 구아니딘계 살균제 등과 같은 유해물질의 분석을 위해, 고분자내 올리고머의 함량을 검출하는 신규의 방법 및 상기 방법에 필요한 신규한 조성의 분석용 시료 조성물 등에 대한 개발의 필요성은 지속적으로 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1503638호(2015.03.17.)

(특허문헌 0002) 일본등록특허 제4141834호(2008.08.27.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명은 물티슈, 손세정제, 콘택트렌즈 세정액, 화장품 리무버 등의 다수의 생활용품에 포함되는 구아니딘계 살균제 등의 고분자내 올리고머를 정량 분석하는 방법을 제공한다.

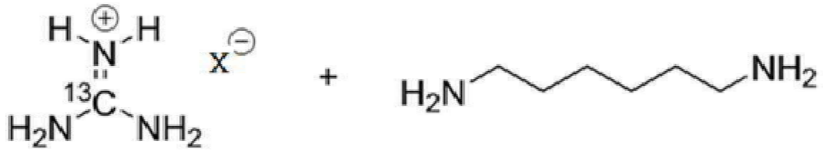
[0012] 또한 본 발명은 상기 고분자내 올리고머의 분석을 위해 사용되는 신규한 표준물질용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 구아니딘 그룹 내 세 개의 질소와 연결된 탄소가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체로서, 상기 구아니딘 그룹내 어느 하나의 질소원자에 탄소수 1 내지 12의 알킬렌 그룹이 연결되거나 또는 바이구아니딘 그룹내 어느 하나의 질소원자에 탄소수 1 내지 12의 알킬렌 그룹이 연결되며, 상기 알킬렌 그룹내 탄소 중 적어도 하나가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘계 중합체를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 하기 구조식 A-1로 표시되는 ^{13}C 표지된 구아니딘 염 및 구조식 B-1로 표시되는 헥사메틸렌디아민의 반응에 의해 얻어지는, ^{13}C 표지된 폴리헥사메틸렌구아니딘(PHMG) 중합체를 제공한다.

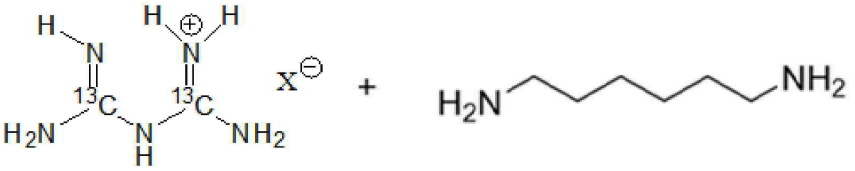


[0016]

[0017] 구조식 A-1 구조식 B-1

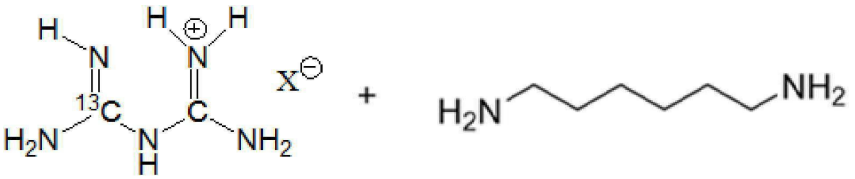
[0018] 단 구조식 A-1에서의 X는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0019] 또한, 본 발명은 하기 구조식 A-2 내지 구조식 A-4 중 어느 하나이상의 ^{13}C 표지된 구아니딘 염 및 구조식 B-1로 표시되는 헥사메틸렌디아민의 반응에 의해 얻어지는, ^{13}C 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체를 제공한다.



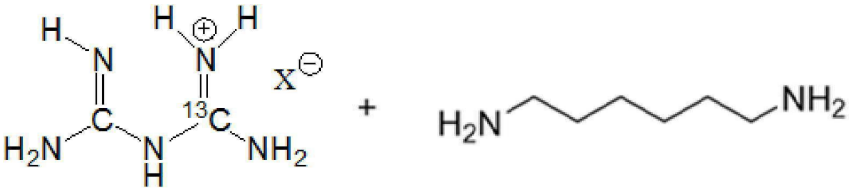
[0020]

[0021] 구조식 A-2



[0022]

[0023] 구조식 A-3



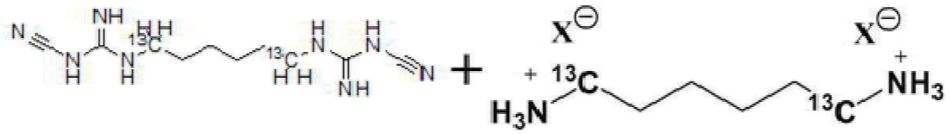
[0024]

[0025] 구조식 A-4 구조식 B-1

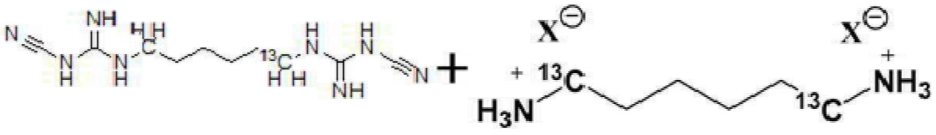
[0026] 단 구조식 A-2 내지 A-4에서의 X는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0027] 또한 본 발명은 하기 구조식 A-5 내지 A-6중에서 선택되는 어느 하나의 화합물과 구조식 B-2로 표시되는 ^{13}C 표

지된 헥사메틸렌디아민 염의 반응에 의해 얻어지는, ^{13}C 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체를 제공한다.

[0028] 

[0029] 구조식 A-5 구조식 B-2

[0030] 

[0031] 구조식 A-6 구조식 B-2

[0032] 단, 구조식 B-2에서의 X는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 ^{13}C 표지된 구아니딘계 중합체를 포함하는, 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 내부 표준물질용 조성물을 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 내부 표준물질(internal standard)용 조성물을 이용하여 질량 분석(Mass spectrometry) 방법을 통해 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법을 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 a) 생활용품로부터 구아니딘계 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계; b) 상기 추출한 샘플용액에 상기 ^{13}C 표지된 구아니딘계 중합체를 포함하는 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MAlDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 c) 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 구아니딘계 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석 하는 단계;를 포함하는 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법을 제공한다.

[0036] 또한 본 발명은 검출대상내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법으로서, a) 검출대상으로부터 고분자 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계; b) 상기 추출한 샘플용액에 방사선 동위원소로 표지된 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MAlDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 고분자 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석하는 단계;를 포함하는 검출대상내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0037] 본 발명은 검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량분석을 위한 신규한 방법을 제공할 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 분석방법의 일예로, 물티슈, 손세정제, 콘택트렌즈 세정액, 화장품 리무버 등의 다수의 생활용품에 포함되는 구아니딘계 살균제 등의 고분자내 올리고머를 정량 분석이 가능한 신규한 방법을 제공한다.

[0039] 또한 본 발명은 상기 고분자내 올리고머의 분석을 위해 사용되는 ^{13}C 표지된 신규한 구아니딘계 중합체 및 이를 포함하는 표준물질용 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명에 따르면, 상기 ^{13}C 표지된 표준물질용 조성물을 사용하여, MAlDI-TOF 질량분석 방법을 이용하는 경우에 고분자내 올리고머 함유량을 최소 1 ppm 까지 정량분석을 신속하게 진행할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 PHMG 올리고머 이성질체의 MAlDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 2는 PHMB 올리고머 이성질체의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 3은 ^{13}C 표지된 PHMG의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 4는 ^{13}C 표지된 PHMB의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 5는 ^{13}C 표지된 PHMG의 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 6은 ^{13}C 표지된 PHMB의 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 7은 내부표준물질로 합성된, ^{13}C 표지된 PHMG의 MALDI-TOF 분석스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 8은 내부표준물질로 합성된, ^{13}C 표지된 PHMB의 MALDI-TOF 분석스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 9는 ^{13}C 표지된 PHMG의 농도별 MALDI-TOF 분석스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 10은 ^{13}C 표지된 PHMB의 농도별 MALDI-TOF 분석스펙트럼을 도시한 그림이다.

도 11은 본 발명의 실시예 1에 따라 내부표준물질을 이용하여 얻어진 PHMG 직선형 검정곡선이다.

도 12는 본 발명의 실시예 2에 따라 내부표준물질을 이용하여 얻어진 PHMB 직선형 검정곡선이다.

도 13은 실시예 3에 따른 고체상 추출 카트리지의 종류별 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 14는 본 발명의 실시예 4에 따른 물티슈에 함유된 PHMG의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 15는 본 발명의 실시예 5에 따른 물티슈에 함유된 PHMG의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 16은 본 발명의 실시예 6에 따른 물티슈에 함유된 PHMB의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 17은 본 발명의 실시예 7에 따른 컨택트렌즈 세정액에 함유된 PHMG의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 18은 본 발명의 실시예 8에 따른 컨택트렌즈 세정액에 함유된 PHMB의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 19는 본 발명의 실시예 9에 따른 화장 제거제에 함유된 PHMG의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 20은 본 발명의 실시예 10에 따른 화장 제거제에 함유된 PHMB의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

도 21은 특정한 농도의 PGH 표준용액과 PEG 표준용액을 섞은 혼합물의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

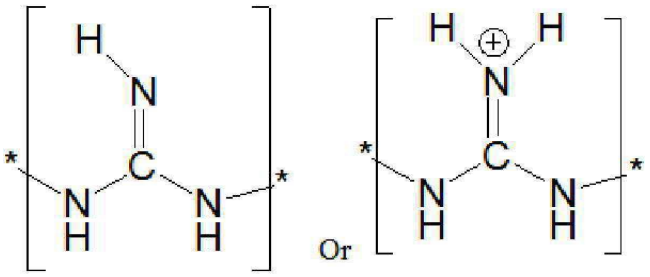
도 22는 본 발명의 실시예 11에 따른 전처리된 PGH 표준용액과 PEG 표준용액을 섞은 혼합물의 MALDI-TOF 분석스펙트럼이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 용이하게 실시할 수 있는 바람직한 실시예를 포함한 발명의 구성을 상세히 설명한다. 본 발명의 바람직한 실시예에 대한 원리를 상세하게 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략한다.

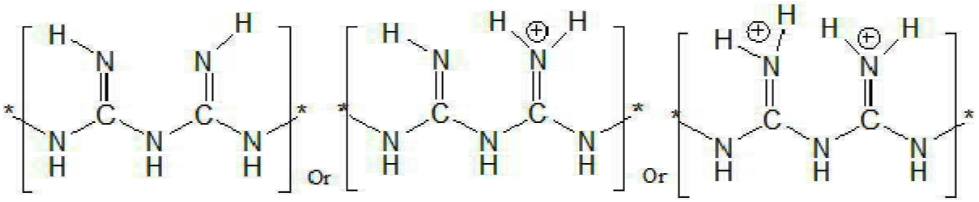
[0043] 본 발명은 구아니딘 그룹 내 세 개의 질소와 연결된 탄소가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체 및 이를 포함하는, 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 내부 표준물질(internal standard)용 조성물에 관한 것이다.

[0044] 여기서, 상기 구아니딘 그룹은 하기 구조식 1에서 도시된 바와 같이 탄소원자 및 상기 탄소원자에 3개의 질소원자가 결합된 구조를 가지는 중성 또는 양이온화 된 그룹을 의미하며, 또한 상기 바이구아니딘 그룹은 하기 구조식 2에서 도시된 바와 같이 두 개의 구아니딘 그룹이 서로 연결되어진 중성 또는 양이온화 된 그룹을 의미한다.



[0045]

[0046] [구조식 1]



[0047]

[0048] [구조식 2]

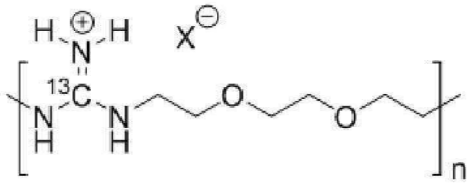
[0049] 본 발명에서 상기 구아니딘 그룹과 바이구아니딘 그룹내에서의 구조식 1 및 구조식 2내 아래쪽 두 개의 질소원자에 연결되는 각각의 치환기는 서로 동일하거나 상이하며, 서로 독립적으로 1가의 연결기로서 상기 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹에 결합 가능한 치환기이면 종류에 제한되지 않고 가능할 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명에서 상기 구아니딘계 중합체는 앞서 정의된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 반복단위를 가짐으로써 중합되어 중합체를 형성하는 고분자 화합물을 의미하며, 이는 소규모의 중합단위에 의해 얻어지는 올리고머성 화합물을 포함한다.

[0051] 즉, 본 발명에서의 구아니딘계 중합체는 상기 구조식 1 및 구조식 2의 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹에서의 세 개의 질소와 연결된 탄소중 적어도 하나가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 것을 특징으로 한다.

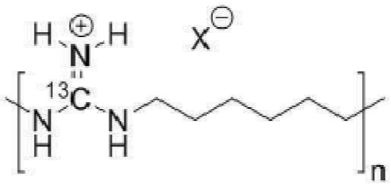
[0052] 본 발명의 바람직한 실시예로 상기 구아니딘계 중합체는 하기 구조식 A 내지 D 중 어느 하나의 반복단위를 포함할 수 있다.

[0053] [구조식 A]



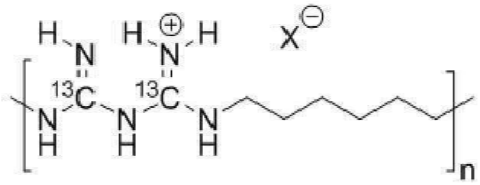
[0054] $X^{\ominus}$ = $OH^{\ominus}$ or $Cl^{\ominus}$ or $Br^{\ominus}$ or $I^{\ominus}$ or $H_2PO_4^{\ominus}$ or $HSO_4^{\ominus}$

[0055] [구조식 B]



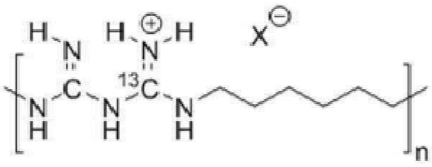
[0056] $X^{\ominus}$ = $OH^{\ominus}$ or $Cl^{\ominus}$ or $Br^{\ominus}$ or $I^{\ominus}$ or $H_2PO_4^{\ominus}$ or $HSO_4^{\ominus}$

[0057] [구조식 C]



[0058] $X^{\ominus}$ = $OH^{\ominus}$ or $Cl^{\ominus}$ or $Br^{\ominus}$ or $I^{\ominus}$ or $H_2PO_4^{\ominus}$ or $HSO_4^{\ominus}$

[0059] [구조식 D]



[0060] $X^{\ominus}$ = $OH^{\ominus}$ or $Cl^{\ominus}$ or $Br^{\ominus}$ or $I^{\ominus}$ or $H_2PO_4^{\ominus}$ or $HSO_4^{\ominus}$

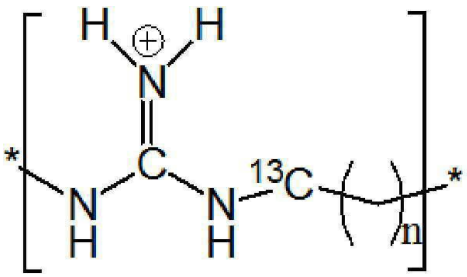
[0061] 단, 상기 구조식 A 내지 D에서의 각각의 화합물의 반복단위는 1 내지 1000 이다.

[0062] 여기서, 상기 구조식 A는 올리고(에톡시)에톡시에틸 구아니딘 중합체(PGH)를 제조하기 위한 반복단위에 해당하며, 상기 구조식 B는 폴리헥사메틸렌구아니딘(PHMG) 중합체를 제조하기 위한 반복단위에 해당하고 상기 구조식 C 및 D는 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체를 제조하기 위한 반복단위에 해당한다.

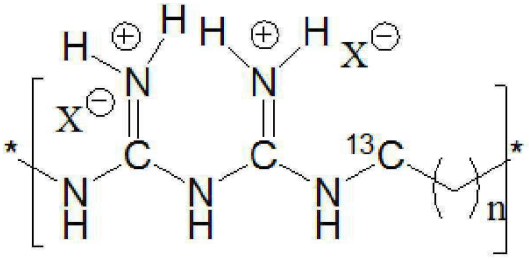
[0063] 또한 본 발명은 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체로서, 상기 구아니딘 그룹내 어느 하나의 질소원자에 탄소수 1 내지 12의 알킬렌 그룹이 연결되거나 또는 바이구아니딘 그룹내 어느 하나의 질소원자에 탄소수 1 내지 12의 알킬렌 그룹이 연결되며, 상기 알킬렌 그룹내 탄소 중 적어도 하나가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 것을 특징으로 하는 구아니딘계 중합체를 제공한다.

[0064] 이 경우에, 본 발명의 구아니딘계 중합체는 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹내에 포함된 탄소가 ^{13}C으로 치환되지 않고 하기 구조식 3 및 4에서 도시되는 바와 같이 상기 구아니딘 그룹내 질소원자에 연결된 알킬렌기내 어느 하나이상의 탄소원자가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 것을 특징으로 한다. 이 경우에 상기 알킬렌기는 탄소수 1 내지 12의 알킬렌기일 수 있다.

[0065] [구조식 3]

[0066] 

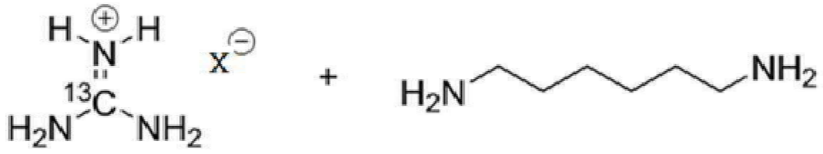
[0067] [구조식 4]



[0068]

[0069] 보다 구체적인 예로서, 본 발명의 상기 구아니딘계 중합체는 ^{13}C으로 표지된 올리고-[2-(2-에톡시)에톡시에틸 구아니디늄 클로라이드(oligo-[2-(2-ethoxy)-ethoxyethyl]-guanidinium chloride; PGH), ^{13}C으로 표지된 폴리헥사메틸렌구아니딘 포스페이트(Polyhexamethyleneguanidine phosphate) 또는 ^{13}C으로 표지된 폴리헥사메틸렌 구아니딘 하이드로클로라이드(Polyhexamethyleneguanidine hydrochloride) 또는 ^{13}C으로 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아나이드 하이드로클로라이드(Polyhexamethylene Biguanide hydrochloride) 또는 ^{13}C으로 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아니티늄 포스페이트(polyhexamethylene biguanidinium phosphate) 중 어느 하나일 수 있다.

[0070] 예시적으로, 상기 구조식 B를 갖는 폴리헥사메틸렌구아니딘(PHMG) 중합체는 하기 반응식 1에 기재된 바와 같이, 구조식 A-1로 표시되는 ^{13}C 표지된 구아니딘 염 및 구조식 B-1로 표시되는 헥사메틸렌디아민의 반응에 의해 얻어질 수 있다.



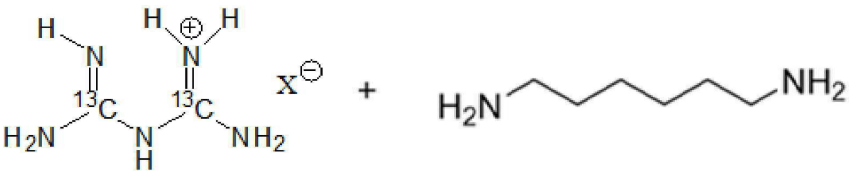
[0071]

[0072] 구조식 A-1 구조식 B-1

[0073] [반응식 1]

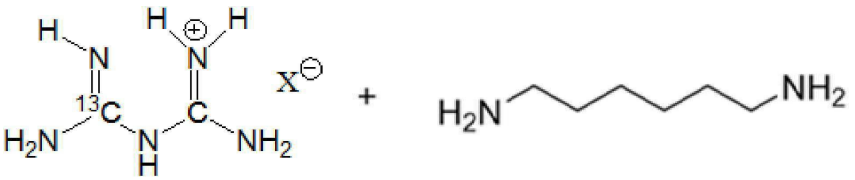
[0074] 단 구조식 A-1에서의 X 는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0075] 또 다른 예시로서, 상기 구조식 C 또는 구조식 D를 갖는 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체는 하기 반응식 2에 기재된 바와 같이, 구조식 A-2 내지 구조식 A-4 중 어느 하나이상의 ^{13}C 표지된 구아니딘 염 및 구조식 B-1로 표시되는 헥사메틸렌디아민의 반응에 의해 얻어질 수 있다.



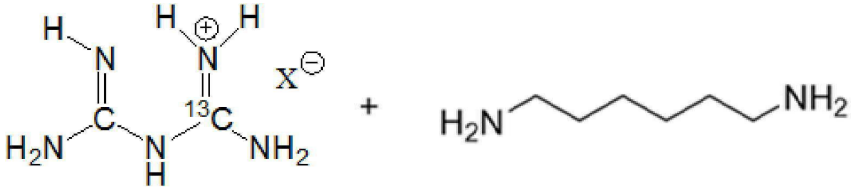
[0076]

[0077] 구조식 A-2 구조식 B-1



[0078]

[0079] 구조식 A-3 구조식 B-1



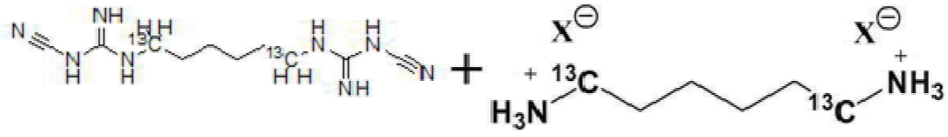
[0080]

[0081] 구조식 A-4 구조식 B-1

[0082] [반응식 2]

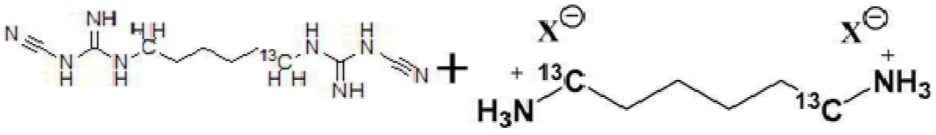
[0083] 단 구조식 A-2 내지 A-4에서의 X는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0084] 또한 본 발명은 상기 구조식 4에 따른, 바이구아니딘 그룹내 질소원자에 연결된 알킬렌기에 포함된 탄소가 ^{13}C으로 치환되어 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체로서, 하기 구조식 A-5 내지 A-6중에서 선택되는 어느 하나의 화합물과 구조식 B-2로 표시되는 ^{13}C 표지된 헥사메틸렌디아민 염의 반응에 의해 얻어지는, ^{13}C 표지된 폴리헥사메틸렌 비구아나이드(PHMB) 중합체를 제공한다.



[0085]

[0086] 구조식 A-5 구조식 B-2



[0087]

[0088] 구조식 A-6 구조식 B-2

[0089] 단, 구조식 B-2에서의 X는 할로겐 또는 1가의 음이온이다.

[0090] 한편 본 발명에서, 상기 반응식 1 또는 반응식 2에서의 1가의 음이온의 구체적인 예로서, 상기 1가의 음이온은 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시 음이온, 탄소수 1 내지 20의 카르복시 음이온, 탄소수 1 내지 20의 알콕시 음이온, 탄소수 1 내지 20의 카보네이트 음이온, 탄소수 1 내지 20의 알킬설포네이트(alkylsulfonate) 음이온, 시아노기, 니트로기, BF_4^-, ClO_4^-, PF_6^-, HCO_3^- 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 한편, 본 발명에서의 상기 ^{13}C으로 표지된 구아니딘 그룹 또는 바이구아니딘 그룹을 포함하는 구아니딘계 중합체는 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량 분석을 위한 내부 표준물질(internal standard)용 조성물로서 사용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 일 실시예로서, 상기 내부 표준물질(internal standard)용 조성물은 질량 분석(Mass spectrometry) 방법, 특히 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석법을 이용하여 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법에 있어 내부 표준물질용 조성물로서 사용될 수 있다.

[0093] 질량분석 방법을 통해 고분자 물질을 분석하기 위한 일반적인 분석법으로서, MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight: 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화법) 질량분석법이 이용되고 있다.

[0094] MALDI-TOF 질량분석기는 시료판위에 분석하고자 하는 시료와 과량의 매트릭스를 섞어 올린 후, 시료/매트릭스 혼합물을 말려 결정구조를 만들고, 이 시료판을 진공의 질량분석기에 넣은 후, 이 시료판 위의 시료에 자외선 혹은 적외선 레이저를 조사하여, 시료를 이온화, 기체화시켜 비행시간 측정 진공 측정 장치로 날리고, 진공 내

에서 검출기까지의 비행시간을 측정하여 질량을 측정하는 기기이다.

[0095] 일반적으로 가벼운 분자는 빨리 날아가 빠른 검출 시간에서 검출되고, 무거운 분자는 느리게 날라고 느린 검출 시간에 검출되는 원리를 이용하여 시료의 질량을 측정한다.

[0096] 시료와 혼합하여 쓰이는 매트릭스로는 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), α-cyano-hydroxycinnamic acid (CHCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (SA: sinapic acid) 등이 있으며, 시료의 특성마다 각기 다른 매트릭스를 최적화하여 사용한다.

[0097] 예컨대, 상기 PHMG의 분석 시에는 DHB와 CHCA 등이 쓰이는 것이 보고된 바 있다. (Int. J. Mass Spectrom. 2013, 356, 1; BuLL. Korean Chem. Soc. 2013, 34, 1708)

[0098] 일반적으로 고분자에 대한 MALDI-TOF 분석은 주로 고분자의 반복기(단량체), 말단기, 평균 분자량, 분산도 등의 정보를 취득하는 정성분석에 치우쳐 있다. 반면에 고분자 MALDI-TOF 정량분석은 MALDI-TOF의 낮은 샘플별 (sample-to-sample), 스팟별 (spot-to-spot), 샷별 (shot-to-shot) 재현성으로 인해 널리 쓰이지 못하고 있으며, 특히, 시료/매트릭스가 매우 불균일한 결정구조를 만들어내 이런 낮은 재현성이 보이는 것으로 알려져 있다.

[0099] 하지만, 최근에 들어 MALDI-TOF 측정시 내부표준물질을 포함하여 질량분석스펙트럼을 획득함으로써 정량성이 높아진다는 연구가 보고되고 있다.

[0100] 또 다른 한편으로는 이온성 액체 매트릭스(Ionic liquid matrix, ILM)를 활용함으로써 시료/매트릭스 결정구조의 불균일성을 극복할 수 있다.(Anal. Chem. 2001, 73, 3679; Anal. Chem. 2004, 76, 2938)

[0101] 본 발명에서의 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법은 a) 생활용품로부터 구아니딘계 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계; b) 상기 추출한 샘플용액에 상기 ^{13}C 표지된 구아니딘계 중합체를 포함하는 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MALDI-TOF(matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 c) 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 구아니딘계 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석 하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0102] 여기서, 상기 생활용품은 물티슈, 콘택트렌즈 세정액, 화장 제거제, 손 세정액, 살균제, 탈취제, 방향제로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0103] 상기 생활용품 내에 함유된 PHMG, PHMB, PGH 올리고머와 같은 구아니딘계 올리고머를 정량분석 하는 경우, 생활용품내에 분석대상물 이외에 다수의 다른 물질들이 바탕 물질로 존재할 가능성이 높기 때문에, PHMG 올리고머, PHMB 올리고머 등의 분석대상이 되는 구아니딘계 올리고머만이 충진제에 바인딩(binding)되어 시료내 불순물은 제거되면서, 동시에 선택적인 분리할 수 있는 전처리 과정이 필요하다.

[0104] 예를 들어, 물티슈의 경우, 수분 함유제로써 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol, PEG)이 과량으로 포함되어 있는 경우가 많은데, PHMG, PHMB를 정량분석하기 위해서는 PEG만을 선택적으로 제거하는 전처리 과정의 개발이 필요하다.

[0105] 이를 위해 상기 구아니딘계 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석함에 있어, 상기 a)단계와 b) 단계 사이에 a-1) 단계로서, 상기 샘플용액을 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extracton, SPE)를 이용하여 샘플을 정제하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0106] 상기 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extracton, SPE)는 시료 전처리에 있어서, 사용법이 간단하면서도 높은 수득률을 가지는 효과적인 정제 방법 중 하나로서, 카트리지의 종류에 따라 다양한 충진제가 충진 되어있는 카트리지를 총칭하며, 기존의 복잡한 시료 전처리 과정을 보다 효과적으로 줄여준다.

[0107] 고체상 추출 카트리지를 이용하여 분석물질이 들어있는 시료내의 방해물질로부터 우리가 원하는 분석물질만을 분리시킬 수 있으며, 서로 다른 용매를 사용함으로써 각각의 물질을 선택적으로 용출시킬 수 있다.

[0108] 또한, 카트리지내 충진 되어있는 충진제가 친수성 또는 소수성을 가짐에 따라 정상(Normanl phase) 카트리지와 역상(Reverse phase) 카트리지로 나눌 수 있으며, 상기 정상(Normal phase) 카트리지는 충진물이 친수성(Hydrophilic) 물질로 충진(packing)되어 있으며, 주로 실리카를 이용하여 정제 및 추출하며, 주로 당(glycan)과 같은 친수성(Hydrophilic) 분석물을 정제 및 추출을 할 때 사용될 수 있고, 역상(Reverse phase) 카트리지는

충진물이 소수성(Hydrophoic) 물질로 충진되어 있으며, 주로 18개의 탄소가 체인형태로 연결된 C-18과, 8개의 탄소가 체인형태로 연결된 C-8 등이 대표적으로 사용될 수 있고, 주로 펩타이드(peptide), 단백질(protein)같은 소수성(Hydrophobic) 분석물을 정제 및 추출 할 때 사용될 수 있다.

[0109] 따라서, 분석물을 정제 및 추출하는 데 있어서 가장 중요한 것은 분석하는 물질의 물리적, 화학적 성질과 분석 목적을 고려하여 다양한 고체상 추출 카트리지 중 분석하고자 하는 목적에 맞게 적합한 충진제가 충진되어 있는 카트리지를 선택하는 것이라 할 수 있다.

[0110] 본 발명에서는 생활용품 내에 존재하는 PHMG 및/또는 PHMB를 분리, 분석하기 위해 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extraction, SPE) 정제법을 이용하며, 다양한 고체상 추출 카트리지 중에서 혼합모드 양이온 교환(Mixed-Mode Cation Exchange, MCX) 카트리지를 이용할 때에 다른 바탕물질을 더욱 용이하게 제거함으로써, 효과적으로 PHMG, PHMB성분만을 선택적으로 추출할 수 있다.

[0111] 본 발명에서 상기 혼합모드 양이온 교환(Mixed-Mode Cation Exchage, MCX) 카트리지를 이용하면 PHMG, PHMB, PGH와 같이 단량체에 구아니딘 그룹을 가지는 구아니딘계 올리고머를 보다 효과적인 분리함으로써 정량분석이 용이할 수 있다.

[0112] 상기 혼합모드 양이온 교환 카트리지는 역상/약한 양이온 교환 비드가 혼합된 형태의 충진제로 구성되어 있으며, 충진제 성분은 고분자 흡수제(polymeric sorbent)로 이루어질 수 있으며, 예컨대 두 개의 모노머(monomer)인 친유성(lipophilc)의 divinylbenzene과 친수성(hydrophilic)의 N-vinylpryrrolidone가 특정비율로 혼합된 고분자(polymer)와 술폰산기(Sulfonic acid)가 혼합된 고분자 비드가 카트리지에 충진된 것을 사용할 수 있다.

[0113] 상기 카트리지내 충진(packing) 되어있는 충진제는 충진물질의 SO_3^- 에 양이온화된 구아니딘 그룹 NH_2^+, NH_3^+ 등이 붙게되며, 전처리 과정 중 세척과정에서 다른 불순물은 세척용액과 함께 제거되면서 선택적인 분리를 가능케 한다.

[0114] 특히, Polyethylene glycol 올리고머가 물티슈 등에 과량 함유되어 있어, 이들 바탕물질을 선택적으로 제거하는 것을 정량분석에 있어서 매우 중요하다. 고체상 추출 카트리지를 이용한 정제단계에서 카트리지의 활성화와 Pre-wet과정으로 평형상태를 만든다.

[0115] 카트리지의 활성화 용매로는 바람직하게는 메탄올(MeOH)을, Pre-wet과정 용매로는 0.1% HCl/MeOH을, 최종 용출용 용매로는 2 M HCl/MeOH를 사용할 수 있다.

[0116] 또한 본 발명에서 상기 b) 단계에서의 질량분석 스펙트럼은 상대농도를 변화시켜 얻어진 시료와 이온성 액체를 혼합하여, 이온성 액체 매트릭스를 이용하여 얻을 수 있다.

[0117] 상기 이온성 액체 매트릭스는 기존의 일반적으로 쓰이는 MALDI-TOF 분석에 쓰이는 매트릭스의 음이온 물질과 염기성 유기물질 양이온이 섞어 만들어진 물질로써, 일반적으로 녹는점이 섭씨 100도 이하의 화합물을 사용할 수 있다.

[0118] 널리 쓰이는 음이온 물질로는 α-cyano-hydroxycinnamate (4-CHCA)와 2,5-dihydroxybenzoate (2,5-DHBA) 등이 있고, 또한, 널리 쓰이는 염기성 유기물질로는 tributylamine, pyridine, 1-methylimidazole 등이 있다. 이들 물질을 1:1로 섞어 만든 이온성 액체 매트릭스는 매우 균일한 박막을 형성하며, 일반적으로 낮은 증기압을 갖는다.

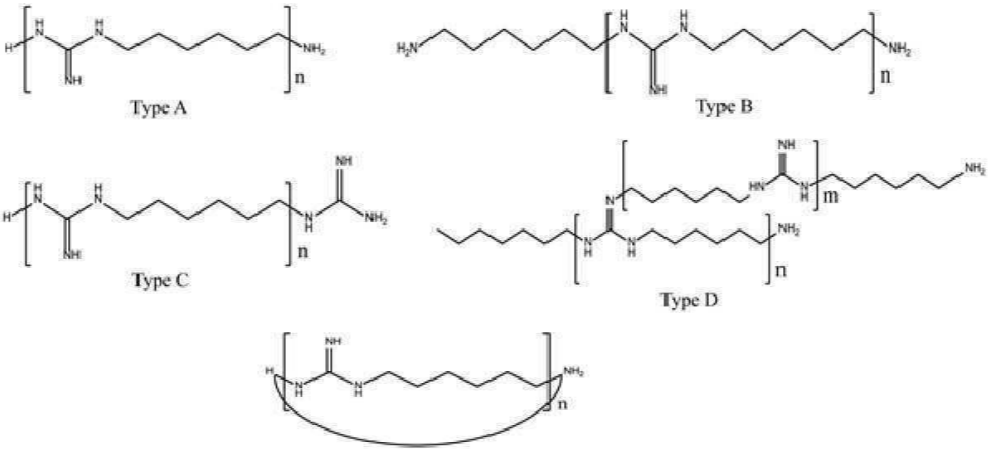
[0119] 한편, 상기 내부표준물질을 이용하는 경우 질량분석기를 이용한 정량분석의 신뢰도를 높일 수 있다. MALDI-TOF의 정량분석에도 내부표준물질을 사용한 예들이 보고된 바 있지만, 이들의 경우, 펩타이드, 탄수화물 등 단분산된 생체물질에 대해서만 내부표준물질을 사용하였지, 고분자 또는 올리고머와 같이 다중 분산된 물질에 대해 내부표준물질을 사용하여 정량 분석한 예는 찾아볼 수 없으며, 특히 본 발명에서와 같이 동위원소를 포함한 내부 표준물질을 사용하는 것은 본 발명의 기술적 특징에 해당된다.

[0120] 본 발명에 따른 질량분석 방법에서의 내부표준물질로는 일반적으로 안정동위원소로 치환된 내부표준물질이 이용될 수 있다.

[0121] 즉, 분석하고자 하는 시료에 ^{13}C 또는 ^{15}N 등의 동위원소가 표지된 내부표준물질을 사용할 경우, 내부표준물질이 분석시료와 화학적, 물리적 성질이 거의 유사하여 전처리 과정에서 차별성이 없고, 질량 분석 시에는 분석 시료

와 약간의 질량차를 보이는 장점을 가지고 있어, 질량분석이 가능한 장점이 있다. 전처리 과정에서 분자별로 다른 수득률을 보이기 때문에, 정량 분석에서는 동위원소가 표지된 내부표준물질을 사용하는 것이 필수적이며, 본 발명에서의 구아니딘계 중합체내 올리고머를 분석 시 고분자 분포를 잘 재현해 낼 수 있는 장점이 있다.

[0122] PHMG 올리고머는 고분자를 구성하는 반복기의 형태에 따라 하기와 같은 이성질체로 구분이 되며, 각각을 A-, B-, C-, D-, E- 타입 PHMG 올리고머로서 구분한다.



[0123]

[0124] 도 1에서는 PHMG 올리고머 이성질체를 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 스펙트럼을 도시하였다. 상기 A-, B-, C-, D-, E- 타입의 PHMG 올리고머들은 다음 크기의 올리고머들과 141 Da의 질량차이를 보이는 특성을 가지고 있고, 반복기의 숫자에 따라 아래의 질량을 가진다.

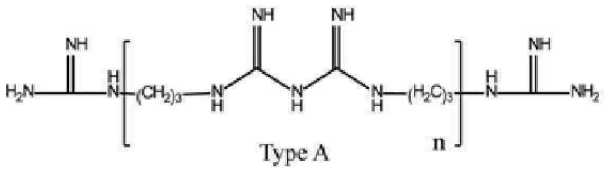
[0125] 이때 MALDI-TOF에서 양성자 하나가 부착되어 $(M+H)^+$ 형태를 띠며, 아래의 표 1에는 이 양성자를 포함한 질량을 보여주고 있다.

표 1

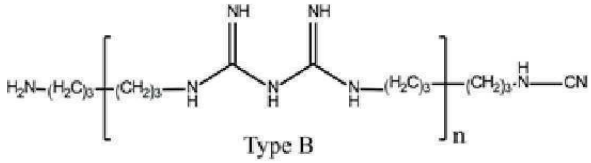
Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A	3	441.4
	4	582.5
	5	723.7
	6	864.8
	7	1005.9
	8	1147.0
B	3	540.5
	4	681.6
	5	822.8
	6	964.0
	7	1105.0
	8	1246.1
C	3	483.4
	4	624.6
	5	765.7
	6	906.8
	7	1047.9
	8	1189.1
D	2	638.6
	3	779.8
	4	920.9
	5	1062.0
	6	1203.1
	7	1344.3
	8	1485.4
E	3	424.4
	4	565.5
	5	706.6
	6	847.8
	7	988.9
	8	1130.0

[0126]

[0127] 또한, PHMB 올리고머는 고분자를 구성하는 말단기의 형태에 따라 하기와 같은 이성질체로 구분이 되며, 각각을 A-, B-, C-, D-, E-, F-, G-, H-, I-, J-, K- ,L-, M- 타입 PHMB 올리고머로써 구분한다.

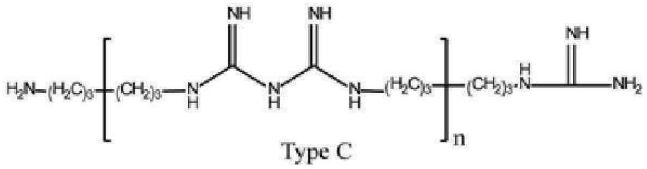


Type A

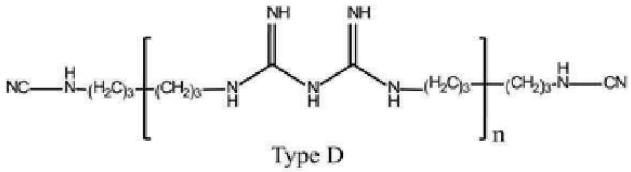


Type B

[0128]

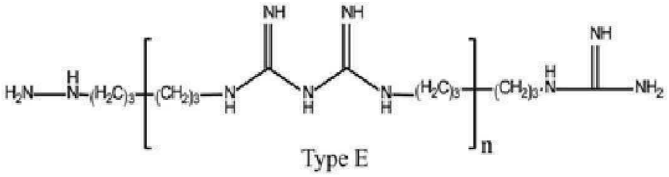


Type C

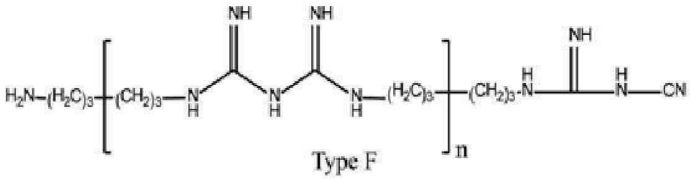


Type D

[0129]

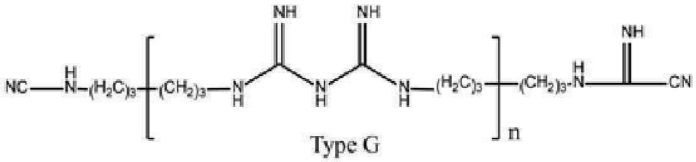


Type E

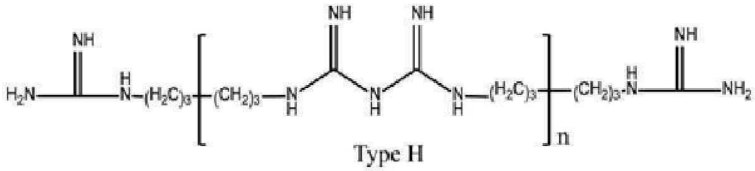


Type F

[0130]

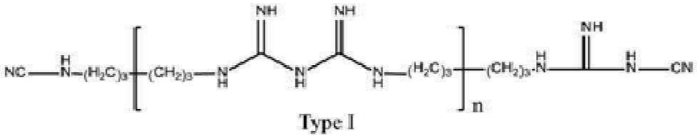


Type G

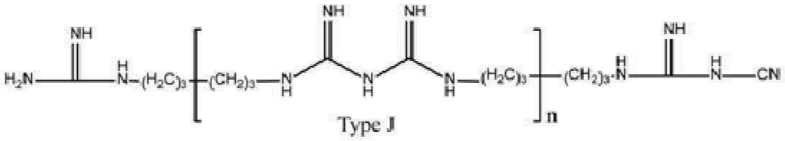


Type H

[0131]

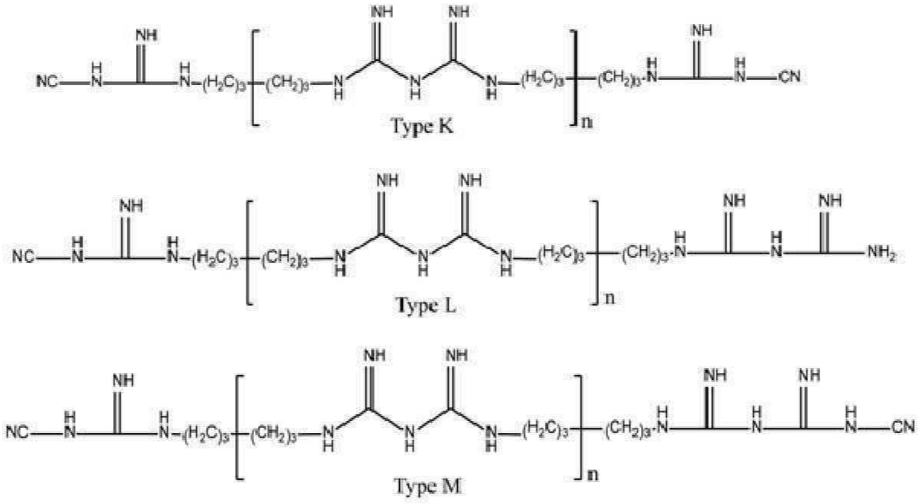


Type I



Type J

[0132]



[0133]

[0134] 도 2에서는 PHMB 올리고머 이성질체를 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 스펙트럼을 도시하였다. 상기 A 타입 내지 M 타입의 PHMB 올리고머들은 다음 반복단위 크기의 올리고머들과 185 Da의 질량차이를 보이는 특성을 가지고 있고, 반복기의 숫자에 따라 아래의 질량을 가진다.

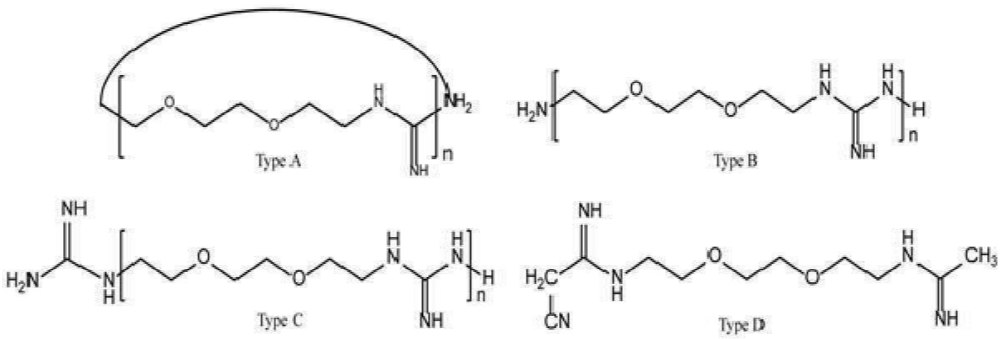
[0135] 이때 MALDI-TOF에서 양성자 하나가 부착되어 $(M+H)^+$ 형태를 띠며, 아래의 표 2에는 이 양성자를 포함한 질량을 보여주고 있다.

표 2

Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A	1	300.2
	2	483.4
	3	666.5
B	1	325.6
	2	508.4
	3	691.6
C	1	342.3
	2	525.5
	3	708.6
D	1	350.3
	2	533.4
	3	716.6
E	1	357.3
	2	540.5
	3	723.6
F	1	367.3
	2	550.5
	3	733.6
G	1	377.3
	2	560.4
	3	743.6
H	1	384.3
	2	567.5
	3	750.6
I	1	392.3
	2	575.4
	3	758.6
J	1	409.3
	2	592.5
	3	775.6
K	1	434.3
	2	617.5
	3	800.6
L	1	451.3
	2	634.5
	3	817.6
M	1	476.3
	2	659.5
	3	842.6

[0136]

[0137] 또한, PGH 올리고머는 고분자를 구성하는 말단기의 형태에 따라 하기와 같은 이성질체로 구분이 되며, 각각을 A-, B-, C-, D- 타입 PGH 올리고머로써 구분한다.



[0138]

[0139] 상기 A-, B-, C-, D- 타입의 PGH 올리고머들은 다음 크기의 올리고머들과 173 Da의 질량차이를 보이는 특성을 가지고 있고, 반복기의 숫자에 따라 아래의 질량을 가진다.

[0140] 이때 MALDI-TOF에서 양성자 하나가 부착되어 $(M+H)^+$ 형태를 띠며, 아래의 표 3에는 이 양성자를 포함한 질량을 보여주고 있다.

표 3

[0141]

Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A	2	348.2
	3	521.4
	4	694.5
	5	867.6
	6	1040.7
B	2	365.3
	3	538.4
	4	711.5
	5	884.6
	6	1057.7
C	2	407.3
	3	580.4
	4	753.5
	5	926.6
	6	1099.8
D	2	430.3
	3	603.4
	4	776.5
	5	949.6
	6	1122.8

[0142] 또한, 본 발명에서는 상기 MALDI-TOF(Matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight) 질량분석법을 이용하여 생활용품 내 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법을 보다 확장하여, 검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법으로서, a) 검출대상으로부터 고분자 중합체의 올리고머를 포함하는 샘플용액을 추출하는 단계; b) 상기 추출한 샘플용액에 방사선 동위원소로 표지된 내부 표준물질용 조성물을 혼합하되, 상기 샘플용액과 내부 표준물질용 조성물의 상대농도를 변화시켜서 시료를 준비하여 이들로부터 각각의 MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) 질량분석 스펙트럼을 얻는 단계; 및 c) 상기 각각의 질량분석 스펙트럼을 이용하여 검량직선을 얻고, 이를 통해, 샘플용액내의 고분자 중합체의 올리고머 함유량을 정량분석하는 단계;를 포함하는 검출대상 내에 포함된 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법을 제공할 수 있다.

[0143] 여기서, 상기 내부표준물질용 조성물은 표준물질의 분자내의 탄소원자 또는 질소원자가 방사선 동위원소로 표지된 것이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 ^{13}C 표지된 화합물을 이용하여 내부 표준물질을 제조하였으나, ^{15}N 으로 표지된 구아니딘계 화합물을 이용하더라도 가능할 것이다.

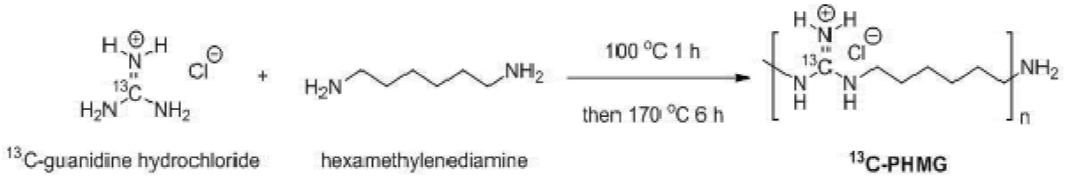
[0144] 또한 상기 b) 단계에서의 질량분석 스펙트럼은 상대농도를 변화시켜 얻어진 시료와 이온성 액체를 혼합하여, 앞서 기재된 바와 같이 이온성 액체 매트리스를 이용하여 얻을 수 있다.

[0145] 이는 상기 구아니딘계 중합체의 올리고머 함량을 정량분석하는 것으로부터 통상의 기술자에게 자명한 것으로 이해되며, 상세한 설명은 앞서 기재된 바로부터 충분히 이해될 것이다.

[0146] 이하에서는 검출대상 내에 포함된 구아니딘계 고분자 중합체의 올리고머 함량을 분석하는 방법의 예시적 실시예로서, 생활용품 내 존재하는 PHMG 올리고머와 PHMB 올리고머의 분석을 위한 MALDI-TOF 질량분석 방법에 대해 설명하나, 이로부터 상기 PHMG 및 PHMB와 유사한 구아니딘계 중합체 내 올리고머의 함량을 분석하는 것은 통상의 기술자에게 자명한 것에 해당할 것이다.

[0147] <제조예 1: ^{13}C-PHMG 의 합성>

[0148] ^{13}C-PHMG의 합성은 하기의 반응식과 같다.

[0149] 

[0150] 먼저 헥사메틸렌다이아민(hexamethylenediamine, 50.0 mg, 0.518 mmol)과 ^{13}C-구아니딘 하이드로클로라이드(^{13}C-guanidine hydrochloride, 60.2 mg, 0.518 mmol)를 같은 몰수로 5 ml 콘(cone)-바이알에 넣고 오픈 스크류 캡 (open screw cap)과 셉텀(septum)으로 닫는다.

[0151] 상기 바이알을 100 °C에서 가열하면서 교반자석을 이용하여 저어준다. 이 상태로 1시간을 가열한 후, 온도를 170 °C로 올려 6시간을 더 가열하여 준다.

[0152] 가열하는 동안 암모니아가 빠져나올 수 있도록 셉텀에 바늘을 꽂아둔다. 반응하는 동안, 반응 혼합물은 노란색의 끈적한 액체가 되며 상온으로 식히면 ^{13}C-PHMG가 고체 상태로 얻어진다(80 mg, 79%).: ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.34 - 6.79 (brm, 7H), 3.33 (s, H_2O), 3.10 (m, 4H), 2.50 (m, DMSO), 1.45 (m, 4H), 1.31 (m, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 157.04, 155.83, 40.45 (DMSO), 28.22, 25.50.

[0153] 도 3 및 도 5에서는 ^{13}C-PHMG의 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR을 통하여 얻은 분석스펙트럼을 나타냈고, 도 7에서는 합성된 ^{13}C-PHMG를 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 분석스펙트럼을 도시하였으며, 하기 표 4에는 합성된 ^{13}C-PHMG 이성질체 올리고머의 질량값을 표시하였다.

표 4

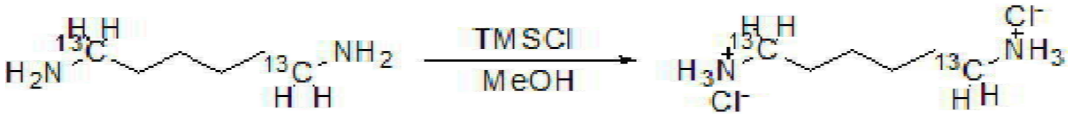
[0154]

Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A*	2	302.2
	3	444.4
	4	586.5
	5	728.7
	6	870.8
	7	1012.9
	8	1155.0
B*	2	401.4
	3	543.5
	4	685.6
	5	827.8
	6	969.9
	7	1112.0
	8	1254.1
C*	2	344.3
	3	486.4
	4	628.6
	5	770.7
	6	912.8
	7	1054.9
	8	1197.1
D*	2	640.6
	3	782.8
	4	924.9
	5	1067.0
	6	1209.1
	7	1351.3
	8	1493.4

[0155] <제조예 2: ^{13}C-PHMB 의 합성>

[0156] ^{13}C-PHMB의 합성은 하기의 반응식과 같다.

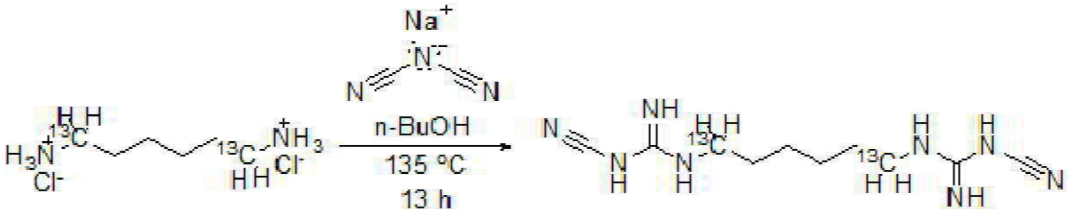
[0157] 1) 1, 6-$^{13}C_2$-헥사메틸란다이아민 다이하이드로클로라이드 (Hexamethylenediamine dihydrochloride)의 합성

[0158] 

[0159] 먼저 1, 6-$^{13}C_2$-헥사메틸렌다이아민(1, 6-$^{13}C_2$-hexamethylenediamine, 55 mg, 0.465 mmol)을 1 dram(4 mL) 바이알에 넣고, 메탄올 1 mL로 용해시켰다. 여기에 트라이메틸실릴 클로라이드(trimethylsilyl chloride, 126 mg, 1.16 mmol)를 한 방울씩 가하였다. 이 용액을 상온에서 30분간 교반하고, 용매와 휘발성 물질들을 진공회전농축기를 이용하여 전부 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 생성물은 추가적인 정제 없이 사용하였다. (83 mg, 93 %): ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 8.22 - 7.71 (brs, 6H), 3.33 (s, H_2O), 2.75 (m, 2H), 2.50 (m, DMSO), 1.54

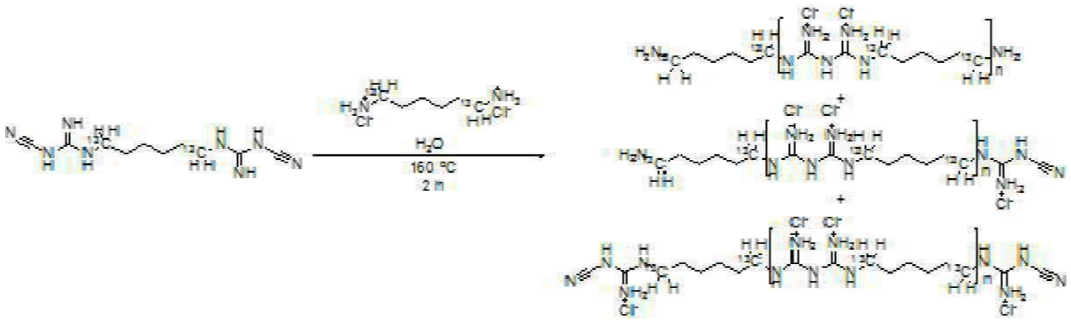
(m, 2H), 1.31 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 40.45 (DMSO), 39.29, 26.95, 25.74.

[0160] 2) 1, 6-$^{13}C_2$-비스구아니도헥산(1, 6-$^{13}C_2$-Bisguanidohexane)의 합성

[0161] 

[0162] 1, 6-$^{13}C_2$-헥사메틸렌다이아민 다이하이드로클로라이드(1, 6-$^{13}C_2$-hexamethylenediamine dihydrochloride, 40 mg, 0.21 mmol)와 소듐 다이사이안아마이드(sodium dicyanamide, 37 mg, 0.42 mmol)를 1 dram 바이알에 넣었다. 이 혼합물을 n-부탄올(n-butanol) 1 mL에 녹이고 8시간 동안 135 ℃로 가열하였다. 반응이 종결된 이후에 혼합물을 상온에서 식히면 고체가 침전되기 시작하며, 이를 필터하여 n-부탄올로 세척해주고, 여액의 용매를 진공회전농축기로 제거하였다. 이렇게 하여 얻은 고체를 물로 재결정하고 필터하여 하얀색 고체를 얻었다. (53 mg, 100 %): ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 7.99 - 6.21 (brm, 6H), 3.33 (s, H_2O), 3.01 (m, 2H), 2.50 (m, DMSO), 1.39 (m, 2H), 1.23 (m, 2H); ^{13}C NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 161.57, 118.80, 41.08, 40.45 (DMSO), 29.29, 26.30.

[0163] 3) ^{13}C-PHMB(^{13}C-polyhexamethylene biguanide)의 합성

[0164] 

[0165] 동일한 당량수의 1, 6-$^{13}C_2$-비스사이아노구아니디노헥산(1, 6-$^{13}C_2$-biscyanoguanidinohexane, 30 mg, 0.157 mmol)과 1, 6-$^{13}C_2$-헥사메틸렌다이아민 다이하이드로클로라이드(1, 6-$^{13}C_2$-hexamethylenediamine dihydrochloride, 40 mg, 0.157 mg)을 5 mL 콘(cone) 바이알에 넣고 증류수 3 mL를 가하여 녹여주었다. 이 용액을 30분 동안 120 ℃로 가열하면서 교반해주어 물을 전부 날려주었다. 이후에 온도를 160 ℃로 올려 2시간 동안 추가로 반응을 진행시켜주었다. 반응이 종결된 이후에 감압하여 물을 전부 제거하는 것으로 추가 정제 없이 노란빛의 고체 생성물을 얻을 수 있었다. (64 mg, 91 %): ^{1}H NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 7.88 - 6.49 (brm, 7H), 3.33 (s, H_2O), 3.08 (m, 4H), 2.50 (s, DMSO), 1.44 (m, 4H), 1.29 (m, 4H); ^{13}C NMR (400 MHz, $(CD_3)_2SO$) δ 161.71, 118.86, 41.13, 40.45 (DMSO), 38.97, 29.10, 25.7. Overall Yield = 85 %

[0166] 도 4 및 도 6에서는 ^{13}C-PHMB의 ^{1}H-NMR과 ^{13}C-NMR을 통하여 얻은 분석스펙트럼을 나타냈고, 도 8에서는 합성된 ^{13}C-PHMB를 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 분석스펙트럼을 도시하였으며, 하기 표 5에는 합성된 ^{13}C-PHMG 이성질체 올리고머의 질량값을 표시하였다.

표 5

Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A*	1	304.2
	2	489.4
	3	674.6
B*	1	329.3
	2	514.4
	3	699.6
C*	1	346.3
	2	531.5
	3	716.6
D*	1	354.3
	2	539.4
	3	724.6
E*	1	361.3
	2	546.5
	3	731.6
F*	1	371.3
	2	556.5
	3	741.6
G*	1	381.3
	2	566.4
	3	751.6
H*	1	388.3
	2	573.5
	3	758.6
I*	1	396.3
	2	581.5
	3	766.6
J*	1	413.3
	2	598.5
	3	783.6
K*	1	438.3
	2	623.5
	3	808.6
L*	1	455.3
	2	640.5
	3	825.7
M*	1	480.3
	2	665.5
	3	850.7

[0167]

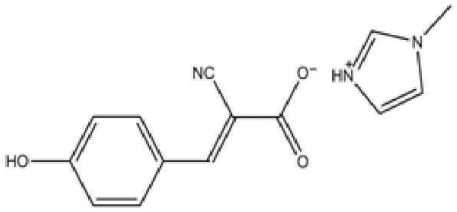
[0168] <실시예 1: SPE 정제 방법을 이용한 PHMG 정량 검정직선 작성>

[0169] 1) 생활용품에서 얻은 용액을 분취하여 얻고 ^{13}C 표지된 PHMG를 내부표준물질로 함께 넣어 고체상 추출 카트리지를 이용하여 정제한다. 카트리지에 샘플을 넣어 추출하기 위해서는 샘플 전처리 과정이 필요하다. 분취한 샘플을 메탄올 용액을 이용하여 1:3 (v:v) 비로 희석시킨 후, 0.1% HCl/MeOH 용액을 소량 넣어 샘플용액을 산성화시킨다.

[0170] 2) 상기에 기재 된 것과 같이 카트리지의 활성화와 Pre-wet과정으로 평형상태인 카트리지에 샘플을 로딩한다. 그 다음, 0.1% HCl/MeOH 용액을 이용하여 여러 번의 세척과정을 거친 후, 용출 용매인 2M HCl/MeOH을 충진제에 용리시킴으로써 분석물질을 용출한다.

[0171] 3) 상기 단계의 고체상 추출된 PHMG 성분 및 ^{13}C PHMG 내부표준물질은 진공회전-건조하여 고체상태로 준비한다. 상기 시료를 재현성과 신뢰성 있는 MALDI-TOF 정량분석하기 위해 하기 화학식 1의 1-mehtylimidazole/α-cyano-hydroxycinnamate 이온성 액체 매트릭스를 이용하여 MALDI-TOF 질량분석하기 위해 시료 준비한다.

[0172] [화학식 1]

[0173] 

[0174] 상기 1-mehtylimidazole/α-cyano-hydroxycinnamate 이온성 액체 매트릭스는 0.2 mol 알파-시아노-4-하이드록시신남산(α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid)을 메탄올에 녹인 후, 0.2 mol 1-메틸 이미다졸(1-Methyl imidazole)을 첨가하여 준비한다.

[0175] 볼텍스 믹서로 1분간 잘 혼합한 후, 반응 진행을 위해 실온에서 5 ~ 10분간 둔다. 증발기로 용매를 날려주고 무게를 다시 재어 매트릭스의 농도가 70 mg/mL가 되도록 메탄올을 이용하여 묽혀준다. 완전히 건조된 분석물질을 다시 물에 녹인 후, 분석물질을 매트릭스와 1:1000 비율로 혼합하여 MALDI 시료판 (예, Anchor chip 시료판 (MTP AnchorChip 384 BC, Part.no 8280790, Bruker))에 로딩하고 완전히 말린 후, MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 분석한다.

[0176] 이후에 PHMG 및 ^{13}C이 표지된 PHMG 내부표준물질의 상대농도를 변화시켜가며 MALDI-TOF 질량분석스펙트럼을 얻어 검량직선을 작성한다.

[0177] <PHMG 정량분석을 위한 검량직선 작성개요>

[0178] 1) 물티슈 용액(^{12}C PHMG가 없는) 800 μL + ^{12}C PHMG 표준용액 100 μL + 내부 표준물(^{13}C 표지된 PHMG) 100 μL(1000 ppm)를 혼합한다.

[0179] (^{12}C PHMG 농도: 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 ppm)

[0180] ① 시료를 산성화하기 위해 0.1% HCl/MeOH 용액을 3 μL 넣어준다.

[0181] ② 메탄올 3 mL를 넣어 시료를 희석시킨다.

[0182] 2) 고체상 추출 카트리지의 컨디셔닝과 평형을 잡아준다.

[0183] (사용한 카트리지: Waters사의 Oasis MCX (Mixed-mode Cation Exchange) 카트리지)

[0184] ① 컨디셔닝: 카트리지에 메탄올을 1 mL씩 3번 흘려준다.

[0185] ② 평형: 카트리지에 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL씩 3번 흘려준다.

[0186] 3) 카트리지에 시료(4 mL)를 로딩한다.

[0187] ① 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL 씩 2번~3번 흘려 불순물을 제거한다.

[0188] ② 2M HCl/MeOH 용액을 1 mL 흘려 시료를 용출한다.

[0189] 4) 용출액을 진공회전증발기(evaporator)를 이용하여 건조시킨다.

[0190] 5) 건조된 시료를 다시 1 mL 증류수에 녹인다.

[0191] 6) 시료 3 μL, ILM-CHCA(이온성 액체 매트릭스) 3 μL와 잘 혼합하여 MALDI 시료 판에 1 μL씩 5 spot씩 로딩하여 분석한다. 마지막으로, 검정 직선을 그린다.

[0192] (X축은 ^{12}C PHMG 농도의 상용로그 값, Y축은 ^{12}C PHMG와 내부표준물(^{13}C 표지된 PHMG)의 비의 상용로그 값)

[0193] 여기서, MALDI-TOF 질량분석기 이용시, 분석 실험조건은 355 nm Nd:YAG 레이저 광원을 사용하였으며, N_2 레이저

를 사용하여도 좋다. 레이저 세기는 구아니딘계를 가지는 폴리머의 분해 및 단편화를 막고, 비교적 큰 PHMG 분자의 상대적으로 낮은 탈착 효과에 의해 야기되는 분포의 불균형화를 줄이기 위해 값을 "Reflectron voltage"가 +2,164V, "Laser percentage"가 50%, "Suppress to 430 Da"로 조절하여 분석한다.

[0194] 하기 표 6은 ^{12}C PHMG 정량분석을 위한 검량직선의 실험값이다.

표 6

	용액의 부피(uL)/^{12}C PHMG의 농도(ppm)		
	물티슈 용액	^{12}C-PHMG 용액	^{13}C-PHMG 용액
1	800 uL / 0 ppm	100uL / 1000 ppm	100uL / 100ppm
2	800 uL / 0 ppm	100uL / 500 ppm	100uL / 100ppm
3	800 uL / 0 ppm	100uL / 300 ppm	100uL / 100ppm
4	800 uL / 0 ppm	100uL / 100 ppm	100uL / 100ppm
5	800 uL / 0 ppm	100uL / 50 ppm	100uL / 100ppm
6	800 uL / 0 ppm	100uL / 10 ppm	100uL / 100ppm
7	800 uL / 0 ppm	100uL / 5 ppm	100uL / 100ppm
8	800 uL / 0 ppm	100uL / 1 ppm	100uL / 100ppm

[0195]

[0196] 도 9는 표 6에 근거하여 ^{12}C PHMG 농도별에 따른 MALDI-TOF 스펙트럼이다. 상기 도 9에 따르면, 다양한 농도의 ^{12}C PHMG와 내부표준물질인 ^{13}C PHMG를 함께 혼합하여 MCX 카트리지 고체상추출 처리 및 제반의 전처리한 후, MALDI-TOF를 통해 분석하여 얻어진 질량스펙트럼이다.

[0197] 상기 도 9의 위쪽에서부터 ^{12}C PHMG의 농도는 1000 ppm, 500 ppm, 300 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm 이고 내부 표준물의 농도는 모두 100 ppm으로 고정 되어 있다. 위에서부터 아래로 갈수록 ^{12}C PHMG의 농도는 1000 ppm에서 1 ppm로 감소한 값을 취하였다. 이에 따라, 내부 표준물인 ^{13}C이 표지된 PHMG의 스펙트럼 peak가 점차 커지면서 상대 강도(Intensity)가 서로 역전되는 것을 확인 할 수 있었다. (A_3: A타입 ^{12}C PHMG, A_3^*: A타입 ^{13}C PHMG, C_3: C타입 ^{12}C PHMG, C_3^*: C타입 ^{13}C PHMG)

[0198] 도 11은 상기 실시예 1에 따라 얻어진 검정직선으로, 검정직선 표준용액인 "^{12}C-PHMG가 없는 물티슈 용액 + ^{12}C-PHMG 표준용액 + 내부표준물질(^{13}C-PHMG)용액"을 사용하였고, 도 11의 각각의 ^{12}C-PHMG 농도별로 얻은 MALDI-TOF 스펙트럼 데이터를 바탕으로 하여 그린 ^{12}C-PHMG직선형 검정곡선이다. y축 값들은 질량분석스펙트럼에서 ^{12}C-PHMG에 해당하는 이온피크들을 면적을 모두 합한 값을 내부표준물(^{13}C-PHMG)의 이온피크들의 면적들을 모두 합한 값으로 나눈 값에 대해 상용로그 처리한 값이고, x축의 값들은 각각의 측정 실험 시 사용된 ^{12}C-PHMG 농도의 상용로그 값이다.

[0199] 검정직선은 y = ax + b 로 표시되며, y는 표준물질과 내부표준물질의 선택이온의 피크 면적 비, x는 표준물질과 내부표준물질의 농도 비, a는 검정직선의 기울기이며, b는 검정직선의 절편을 의미한다. 이 실험을 통해 직선형 검정선의 a값과 b값을 결정한다.

[0200] <실시예 2: SPE 정제 방법을 이용한 PHMB 정량 검정직선 작성>

[0201] 생활용품에서 PHMB를 정량하기 위해서, 상기 실시예 1의 과정과 동일하되, 내부표준물질로서 ^{13}C 표지된 PHMG 대

신에 ^{13}C 표지된 PHMB를 사용하였다.

[0202] 이후에 PHMB 및 ^{13}C이 표지된 PHMB 내부표준물질의 상대농도를 변화시켜가며 MALDI-TOF 질량분석스펙트럼을 얻어 검량직선을 작성한다.

[0203] <PHMB 정량분석을 위한 검량직선 작성개요>

[0204] 1) 물티슈 용액(^{12}C PHMB가 없는) 800 μL + ^{12}C PHMB 표준용액 100 μL + 내부 표준물(^{13}C 표지된 PHMB) 100 μL(1000 ppm)를 혼합한다.

[0205] (^{12}C PHMB 농도: 10000, 5000, 1000, 500, 100, 50, 10 ppm)

[0206] ① 시료를 산성화 하기위해 0.1% HCl/MeOH 용액을 3 μL 넣어준다.

[0207] ② 메탄올 3 mL를 넣어 시료를 희석 시킨다.

[0208] 2) 고체상 추출 카트리지의 컨디셔닝과 평형을 잡아준다.

[0209] (사용한 카트리지: Waters사의 Oasis MCX (Mixed-mode Cation Exchange) 카트리지)

[0210] ① 컨디셔닝: 카트리지에 메탄올을 1 mL씩 3번 흘려준다.

[0211] ② 평형: 카트리지에 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL씩 3번 흘려준다.

[0212] 3) 카트리지에 시료(4 mL)를 로딩한다.

[0213] ① 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL 씩 2번~3번 흘려 불순물을 제거한다.

[0214] ② 2 M HCl/MeOH 용액을 1 mL 흘려 시료를 용출한다.

[0215] 4) 용출액을 진공회전증발기(evaporator)를 이용하여 건조시킨다

[0216] 5) 건조된 시료를 다시 1 mL 증류수에 녹인다.

[0217] 6) 시료 3 μL, ILM-CHCA((이온성 액체 매트릭스) 3 μL와 잘 혼합하여 MALDI 시료 판에 1 μL씩 5 spot씩 로딩하여 분석한다. 마지막으로, 검정 직선을 그린다.

[0218] (X축은 ^{12}C PHMB 농도의 상용로그 값, Y축은 ^{12}C PHMB와 내부표준물(^{13}C 표지된 PHMB)의 비의 상용로그 값)

[0219] MALDI-TOF 질량분석기 이용시, 분석 실험조건은 355 nm Nd:YAG 레이저 광원을 사용하였으며, N_2 레이저를 사용하여도 좋다. 레이저 세기는 구아니딘계를 가지는 폴리머의 분해 및 단편화를 막고, 비교적 큰 PHMB 분자의 상대적으로 낮은 탈착 효과에 의해 야기되는 분포의 불균형화를 줄이기 위해 값을 “Reflectron voltage”가 +2,164V, “Laser percentage”가 50%, “Suppress to 310 Da”로 조절하여 분석한다.

[0220] 하기 표 7는 ^{12}C PHMB 정량분석을 위한 검량직선의 실험값이다.

표 7

	용액의 부피(ul)/^{12}C PHMB의 농도(ppm)		
	물티슈 용액	^{12}C-PHMB 용액	^{13}C-PHMB 용액
1	800 uL / 0 ppm	100uL / 1000 ppm	100uL / 100ppm
2	800 uL / 0 ppm	100uL / 500 ppm	100uL / 100ppm
3	800 uL / 0 ppm	100uL / 300 ppm	100uL / 100ppm
4	800 uL / 0 ppm	100uL / 100 ppm	100uL / 100ppm
5	800 uL / 0 ppm	100uL / 50 ppm	100uL / 100ppm
6	800 uL / 0 ppm	100uL / 10 ppm	100uL / 100ppm
7	800 uL / 0 ppm	100uL / 5 ppm	100uL / 100ppm
8	800 uL / 0 ppm	100uL / 1 ppm	100uL / 100ppm

[0221]

[0222] 도 10은 표 7에 근거하여 ^{12}C PHMB 농도별에 따른 MALDI-TOF 스펙트럼이다. 상기 도 10에 따르면, 다양한 농도의 ^{12}C PHMB와 내부표준물질인 ^{13}C PHMB를 함께 혼합하여 MCX 카트리지 고체상추출 처리 및 제반의 전처리한 후, MALDI-TOF를 통해 분석하여 얻어진 질량스펙트럼이다.

[0223] 상기 도 10의 위쪽에서부터 ^{12}C PHMB의 농도는 1000 ppm, 500 ppm, 300 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm 이고 내부 표준물의 농도는 모두 100 ppm으로 고정 되어 있다. 위에서부터 아래로 갈수록 ^{12}C PHMB의 농도는 1000 ppm에서 1 ppm로 감소한 값을 취하였다. 이에 따라, 내부 표준물인 ^{13}C이 표지된 PHMB의 스펙트럼 peak가 점차 커지면서 상대 강도(Intensity)가 서로 역전되는 것을 확인 할 수 있었다. (A_1: A타입 ^{12}C PHMB, A_1^*: A타입 ^{13}C PHMB, B_1: B타입 ^{12}C PHMB, B_1^*: B타입 ^{13}C PHMB, C_1: C타입 ^{12}C PHMB, C_1^*: C타입 ^{13}C PHMB, F_1: F타입 ^{12}C PHMB, F_1^*: F타입 ^{13}C PHMB, H_1: H타입 ^{12}C PHMB, H_1^*: H타입 ^{13}C PHMB)

[0224] 도 12는 상기 실시예 2에 따라 얻어진 검정직선으로, 검정직선 표준용액인 "^{12}C-PHMB가 없는 물티슈 용액 + ^{12}C-PHMB 표준용액 + 내부표준물질(^{13}C-PHMB)용액"을 사용하였고, 도 12의 각각의 ^{12}C-PHMB 농도별로 얻은 MALDI-TOF 스펙트럼 데이터를 바탕으로 하여 그린 ^{12}C-PHMB직선형 검정곡선이다. y축 값들은 질량분석스펙트럼에서 ^{12}C-PHMB에 해당하는 이온피크들을 면적을 모두 합한 값을 내부표준물(^{13}C-PHMB)의 이온피크들의 면적들을 모두 합한 값으로 나눈 값에 대해 상용로그 처리한 값이다. x축의 값들은 각각의 측정 실험 시 사용된 ^{12}C-PHMB 농도의 상용로그 값이다.

[0225] <실시예 3: 카트리지의 선택>

[0226] 생활용품 내 존재하는 PHMG, PHMB과 같은 구아니딘계 올리고머 분석시, 가장 큰 바탕잡음으로 나타나는 물질인 PEG를 선택적으로 제거하기 위해 적절한 카트리지의 선택이 필요하며, 본 발명에서는 구아니딘계 올리고머 정량분석에 알맞은 카트리지 선택을 위해 구아니딘계 올리고머 중 하나인 PHMG와 PEG가 적당하게 섞인 혼합물을 만들었고, 범용으로 사용되는 고체상 추출 카트리지(Solid Phase Extraction, SPE) 중 4종의 카트리지를 선택하여 정제한 후 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 분석하였다.

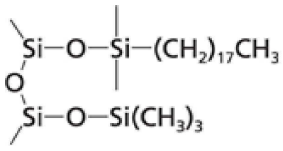
[0227] 도 13은 고체상 추출 카트리지의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼이다.

[0228] 도 13의 (a)는 기준이 되는 카트리지로 PHMG와 PEG를 적당량 섞은 혼합물을 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여

얻은 스펙트럼이다. 상기의 분석을 통하여, PHMG와 PEG가 나타나는 올리고머 분포를 확인할 수 있다.

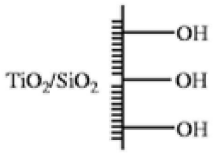
[0229] 도 13의 (b)는 고체상 추출 카트리지에서 많이 사용되는 C-18 카트리지를 이용하여 PHMG를 정제하였다. C-18 카트리지의 충진제는 하기 화학식 2와 같고, 사용한 용매는 세척과정에서 0.1% TFA/H2O를, 용리 과정에서는 TA50 (10 mL 기준, Acetonitrile: 5 mL, H_2O: 4.6 mL. 2.5% TFA: 400 μL)를 사용하였다.

[0230] [화학식 2]

[0231] 

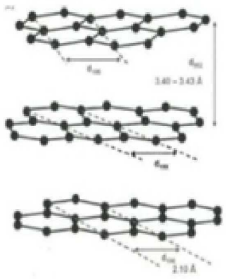
[0232] 도 13의 (c)는 Titanium Dioxide 카트리지로 충진제 구조는 하기 화학식 3과 같다. 사용한 용매는 세척과정에서 20 mg/mL DHB(2,5-Dihydroxybenzoic acid)/TA10 과 TA10(1 mL 기준, Acetonitrile: 1 mL, H_2O: 8.6 mL. 2.5% TFA: 400 μL)를, 용리과정에서는 TA80(1 mL 기준, Acetonintrile: 8 mL, H_2O: 1.6 mL. 2.5% TFA: 400 μL)를 사용하였다.

[0233] [화학식 3]

[0234] 

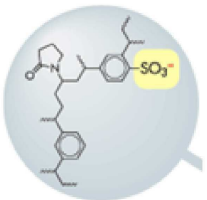
[0235] 도 13의 (d)는 Porous Graphite Carbon Black 카트리지로 충진제의 구조는 하기 화학식 4와 같다. 사용한 용매는 세척과정에서는 H_2O를, 용출과정에서는 TA50(10 mL 기준, Acetonitrile: 5 mL, H_2O: 4.6 mL. 2.5 % TFA: 400 μl)를 사용하였다.

[0236] [화학식 4]

[0237] 

[0238] 도 13의 (e)는 Mixed-mode Cation Exchange 카트리지로 충진제의 구조는 하기 화학식 5와 같다. 역상/약한 양이온 교환 비드가 혼합된 형태로 사용되는 카트리지로, 충진제의 pK_a<1 이면서, 습윤성을 가지고 있고, pH 범위 0-14정도의 넓은 범위에서 안정적으로 이용될 수 있다. 염기성 분자를 선택적으로 분리할 수 있으며, 유기용매에 안정하다. 사용한 용매는 세척과정에서 0.1% HCl/MeOH를, 용리과정에서는 2 M HCl/MeOH를 사용하였다.

[0239] [화학식 5]

[0240] 

[0241] 실시예 1과 2에 따르면, MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 생활용품 내 존재하는 구아니딘계 올리고머를 정성 및 정량분석을 하기 위해서는 불순물 제거과정을 수행함으로써, 개선된 효과를 나타낼 수 있으며, PEG나 다른 바탕잡음을 없애고, PHMG, PHMB만을 선택적으로 분리하기 위해서는 고체상 추출 카트리지 중 혼합모드- 양이온 교환 카트리지(Mixed-mode Cation Exchage, MCX)가 최적의 효과를 나타낼 수 있어 적합한 것을 확인 할 수 있다.

[0242] <실시예 4: 고체상 추출 카트리지를 이용한 한국에서 제조된 물티슈의 PHMG분석>

[0243] 1) 한국에서 제조된 물티슈를 플라스틱 주사기를 이용하여 짠 후, 900 μL의 물티슈 용액을 분취하여 얻은 후, 내부 표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMG를 100 μL를 함께 넣어 잘 섞어준다.

[0244] 2) 그 후에 메탄올 3 mL 넣어준 후, 용액을 산성화시키기 위해 0.1% HCl/MeOH 3 μL 를 가한 후, 다시 볼텍스 믹서를 이용해 1분간 잘 혼합해준다.

[0245] 3) 고체상 추출을 하기 위해 MCX 카트리지의 활성화와 Pre-wet 과정을 해준다. 카트리지의 활성화는 카트리지 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용 할 경우는 3 mL의 메탄올을 흘려주며, Pre-wet 과정은 0.1% HCl/MeOH로 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용 할 경우는 3 mL의 메탄올을 1 mL씩 3번 흘려줌으로써 카트리지의 컨디션을 잡아준다.

[0246] 4) 카트리지에 샘플을 로딩한다. 첫 번째 로딩을 할 때는 카트리지의 입구가 막혀있어 용매가 잘 통과하지 못하므로 질소나 공기압력을 이용하여 천천히 밀어주는 주는 것이 좋다. 모든 샘플을 로딩시킨 후, 세척과정(0.1% HCl/MeOH)을 거친다. 세척과정의 경우 불순물의 양에 따라 횟수를 줄이거나 늘려도 좋다.

[0247] 5) 세척과정이 끝나면, 2 M HCl/MeOH 용매를 카트리지에 용리시켜 분석물질을 용출한 다음 진공회전증발기를 이용하여 용매를 완전히 날려 건조시킨 후, 고체상태로 샘플을 얻는다.

[0248] 6) 완전히 건조된 시료를 1 mL의 물에 녹인다. 시료가 준비되면 분석물질 1 μL와 매트릭스인 ILM-CHCA(이온성 액체 매트릭스) 1 μL를 잘 혼합하여, Anchor chip MALDI 시표판에 1 μL를 로딩하여 분석한다. 시료 판을 데시케이터에 넣어 용매를 완전히 건조시킨 후 분석한다.

[0249] 도 14는 실시예 4의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼을 나타내고 있으며, 이의 스펙트럼 분석결과 한국에서 제조된 물티슈에는 PHMG 함량이 검출한계 이하로 나타났으며, 레이블 된 피크 옆에 *로 표시된 부분은 사용된 내부표준물질인 ^{13}C-PHMG이다.

[0250] <실시예 5: 고체상 추출 카트리지를 이용한 중국에서 제조된 물티슈의 PHMG분석>

[0251] 1) Norm Jet 플라스틱 주사기를 사용해서 PHMG가 들어있는 물티슈(제조국:중국)를 짜내어, 짠 용액에서 900 μL를 얻고, 내부 표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMG 1000 ppm을 100 μL를 함께 넣어 잘 섞어준다.

[0252] 2) 샘플용액 1 mL에 3 mL 메탄올을 넣어 묽힌 후, 산성화를 시키기 위해 0.1% HCl/MeOH 3 μL를 가한다. 시료를 볼텍스 믹서로 1분간 잘 혼합해준다.

[0253] 3) 고체상 추출 카트리지를 이용하여 PHMG를 정제를 하기위해 MCX 카트리지(Mixed-mode Cation Exchange)의 활성화와 pre-wet 과정을 해준다. 카트리지의 활성화는 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 메탄올을 흘려준다. 1 mL씩 3번 흘려주어 카트리지의 컨디션을 잡아 준다. Pre-wet 과정은 0.1% HCl/MeOH로 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 0.1% HCl/MeOH 1 mL씩 3번 흘려주어 컨디션의 평형을 잡아준다.

[0254] 4) 평형상태의 카트리지에 전처리된 샘플을 로딩한 후, 분석하고자 하는 물질 외의 불순물을 제거하기 위해 세척 과정을 진행한다. 세척 과정은 사전에 만들어 둔 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL씩 흘려 세척한다. 0.1% HCl/MeOH 용액을 카트리지 부피의 3배정도 흘려 세척하며, 불순물이 많은 경우는 세척 횟수를 조절하여 완전히 세척하는 것이 바람직하다.

[0255] 5) 세척 과정 후, 분석 물질을 카트리지 충진제와 분리시켜 용리액과 함께 용출된다. 용리액은 2 M HCl용액을 1 mL씩 2회 흘려 시료를 완전히 용출시킨다. 그 다음, 진공회전증발기를 이용하여 용매를 완전히 건조시켜 고체상태의 샘플을 얻는다.

[0256] 6) 완전히 건조된 시료를 1 mL의 물에 녹인다. 준비된 시료의 1 μL와 매트릭스인 ILM-CHCA(이온성 액체 매트릭

스) 1 μL를 잘 혼합하여, Anchor chip MALDI 플레이트에 1 μL씩 1 spot씩 로딩하여 분석한다. 시료 판을 데시케이터에 넣어 용매를 완전히 건조시킨후 플레이트 위에 건조된 샘플을 분석하기 위해 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한다.

[0257]

[0258] 도 15는 실시예 5의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼이다. 한편, 도 15의 (a)는 실시예 5에 따른 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한하여 얻은 질량분석스펙트럼이며, (b)는 스펙트럼을 얻을 때, 가장 크게 나오는 피크인 A_3 타입과 C_3 타입을 확대시킨 스펙트럼이다. 레이블 된 피크 옆에 * 무늬는 사용된 내부표준물질, ^{13}C PHMG의 피크를 나타내었다.

[0259] 상기 스펙트럼에서 다양한 타입의 PHMG 구조와 각각의 타입별로 단량체들은 141 da 차이가 나는 것을 확인 할 수 있다, 또, A, B, C 타입별로 고분자 분포를 확인 할 수 있다.

[0260] 또한, 도 15의 (a) 스펙트럼의 질량값을 표 8에 기재하였고, 물티슈(제조국:중국) 내에 존재하는 PHMG 함량분석 통계 데이터를 표 9에 기재하였다.

표 8

[0261]

Type	n (단량체 수)	질량값(m/z)
A	3	441.4
	4	582.5
	5	723.7
	6	864.8
B	3	540.5
	4	681.6
	5	822.8
	6	963.8
C	3	483.4
	4	624.5
	5	765.7
	6	-
D	3	780.8
	4	921.8
E	3	424.4
	4	564.1

표 9

[0262]

y = 0.8012x+3.1912			
	y값 (PHMG와 내부표준물 ratio의 log 값)	x값 (PHMG농도의 log 값, g/mL)	PHMG 함량 (g/mL)
1회	0.910091	-2.847116	0.0014219
2회	0.905028	-2.853435	0.0014014
평균	0.907559	-2.85028	0.0014219

[0263] 또한, 검량직선을 얻기 위해 상기 중국산 물티슈를 2장을 뽑아서 잘 짠 후, 내부 표준물질과 잘 섞어서 각각 카트리지를 이용하여 전처리를 하였다. 전처리된 분석물을 다시 희석시킨 후, 1 μL씩 각각 1 spots를 로딩하였다. 또, 1000 shots씩 10번을 합하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다.

[0264] 총 2개의 스펙트럼을 얻어 Σ(모든 PHMG 이온 피크의 합)/Σ(모든 ^{13}C 동위원소 치환된 PHMG 이온 피크의 합)을 통해 상대적인 ratio를 구한 다음 상용 log값을 취해 y값을 구한다. 구한 y값을 사전에 그린 검정직선을 통해 얻은 수식에 대입한다. x=log[PHMG]이므로 계산을 통해 물티슈 내에 존재하는 PHMG 함량의 상용log값을 x값으로 구할 수 있다. 따라서 물티슈 내에 존재하는 PHMG 함량은 $[PHMG]=10^{-x}$를 통해 구할 수 있다.

[0265] <실시예 6: 고체상 추출 카트리지를 이용한 중국에서 제조된 물티슈의 PHMB분석>

[0266] 실시예 4와 동일한 과정을 거쳐 분석하되, 분석대상을 한국에서 제조된 물티슈 대신에 중국에서 제조된 물티슈를 이용하여 분석하였으며, PHMG 올리고머 대신에 PHMB 올리고머를 분석하였다.

[0267] 도 16은 실시예 6의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼을 나타내고 있으며, 레이블 된 피크 옆에 *로 표시된 부분은 사용된 내부표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMB이다.

[0268] 또한, 도 16의 스펙트럼의 질량값을 표 10에 기재하였고, 물티슈내에 존재하는 PHMB 함량분석 통계 데이터를 표 11에 기재하였다.

표 10

[0269]

Type	n (단량체수)	질량값(m/z)
B	1	325.3
	2	508.4
C	1	342.3
D	1	350.3
	2	533.4
A*	1	304.2
C*	2	531.4
D*	1	354.3
F*	1	371.3
H*	1	388.3

표 11

[0270]

y = 0.8026x+3.0057			
	y값 (PHMB와 내부표준물 ratio의 log 값)	x값 (PHMB농도의 log 값, g/mL)	PHMB 함량 (g/mL)
1회	-0.238288	-4.044092	0.00009
2회	-0.265844	-4.078425	0.00008
평균	-0.25207	-4.06126	0.000085

[0271] 또한, 검량직선을 얻기 위해 상기 물티슈(제조국:중국)를 2장을 뽑아서 잘 짠 후, 내부 표준물질과 잘 섞어서 각각 카트리지를 이용하여 전처리를 하였다. 전처리된 분석물을 다시 희석시킨 후, 1 μL씩 각각 1 spots를 로딩하였다. 또, 1000 shots씩 10번을 합하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다. 총 2개의 스펙트럼을 얻어 Σ(모든 PHMB 이온 피크의 합)/Σ(모든 ^{13}C 동위원소 치환된 PHMB 이온 피크의 합)을 통해 상대적인 ratio를 구한 다음 상용 log값을 취해 y값을 구한다. 구한 y값을 사전에 그린 검정직선을 통해 얻은 수식에 대입한다. x=log[PHMB]이므로 계산을 통해 물티슈 내에 존재하는 PHMB 함량의 상용log값을 x값으로 구할 수 있다. 따라서 물티슈 내에 존재하는 PHMB 함량은 $[PHMB]=10^{-x}$를 통해 구할 수 있다.

[0272] <실시예 7: 고체상 추출 카트리지를 이용한 콘택트렌즈 세정액 내의 PHMG분석>

[0273] 1) 콘택트렌즈 세정제의 경우, 실온에 액체상으로 존재하므로 액체상 자체에서 900 μL를 분취하여 얻고, 내부표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMG 1000 ppm, 100 μL를 잘 혼합 한다.

[0274] 2) 샘플용액 1 mL에 3 mL 메탄올을 넣어 묽힌 후, 산성화를 시키기 위해 0.1% HCl/MeOH 3 μL를 가한다. 시료를 볼텍스 믹서로 1분간 잘 혼합해준다.

[0275] 3) 고체상 추출 카트리지를 이용하여 PHMG를 정제를 하기 위해 MCX 카트리지(Mixed-mode Cation Exchange)의 활성화와 pre-wet 과정을 해준다. 카트리지의 활성화는 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 메탄올을 흘려준다. 1 mL씩 3번 흘려주어 카트리지의 컨디션을 잡아 준다. Pre-wet 과정은 0.1% HCl/MeOH로 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 0.1% HCl/MeOH 1 mL씩 3번 흘려주어 컨디션의 평형을 잡아준다.

[0276] 4) 평형상태의 카트리지에 전처리된 샘플을 로딩한 후, 분석하고자 하는 물질 외의 불순물을 제거하기 위해 세척 과정을 진행한다. 세척 과정은 사전에 만들어 둔 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL씩 흘려 세척한다. 0.1% HCl/MeOH 용액을 카트리지 부피의 3배정도 흘려 세척하며, 불순물이 많은 경우는 세척 횟수를 조절하여 완전히 세척하는 것이 바람직하다.

[0277] 5) 세척 과정 후, 분석 물질을 카트리지 충진제와 분리 시켜 용리액과 함께 용출된다. 용리액은 2 M HCl 용액을 1 mL씩 2회 흘려 시료를 완전히 용출시킨다. 그 다음, 진공회전증발기를 이용하여 용매를 완전히 건조시켜 고체상태의 샘플을 얻는다.

[0278] 6) 완전히 건조된 시료를 1 mL의 물에 녹인다. 준비된 시료의 1 μL와 매트릭스인 ILM-CHCA(이온성 액체 매트릭스) 1 μL를 잘 혼합하여, Anchor chip MALDI 플레이트에 1 μL씩 1 spot씩 로딩하여 분석한다. 시료 판을 데시케이터에 넣어 용매를 완전히 건조시킨후 MALDI-TOF 질량분석기를 이용한다.

[0279] 도 17은 본 발명에 따른 실시예 7의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼이다. 스펙트럼의 분석 결과, ^{13}C 표지된 PHMG 외에 다른 PHMG 피크는 확인되지 않았으며, 이로 인해 콘택트렌즈 세정액 내의 PHMG

함량은 검출한계 이하 및 없음이 확인되었다. 레이블 된 피크 옆에 * 무늬는 사용된 내부표준물질, ^{13}C 표지된 PHMG의 피크를 나타내었다.

[0280] <실시예 8: 고체상 추출 카트리지를 이용한 콘택트렌즈 세정액 내의 PHMB분석>

[0281] 실시예 7과 동일한 과정을 거쳐 분석하되, 정량분석 대상을 PHMG 올리고머 대신에 PHMB 올리고머를 분석하였다.

[0282] 도 18은 실시예 8의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼을 나타내고 있으며, 레이블 된 피크 옆에 *로 표시된 부분은 사용된 내부표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMB이다.

[0283] 또한, 도 18의 스펙트럼의 질량값을 하기 표 12에 기재하였고, 콘택트렌즈 세정액 내에 존재하는 PHMB 함량분석 통계 데이터를 하기 표 13에 기재하였다.

표 12

[0284]

Type	n (단량체수)	질량값(m/z)
A	3	666.5
B	3	691.5
E	1	357.3
G	1	377.3
A*	1	304.2
	2	489.4
B*	2	531.4
C*	1	354.3
	2	531.5
F*	1	371.3
H*	1	388.3
	2	573.5

표 13

[0285]

y = 0.8026x +3.0057

	y값 (PHMB와 내부표준물 ratio의 log 값)	x값 (PHMB농도의 log 값, g/mL)	PHMB 함량 (g/mL)
1회	-0.943256	-4.920204	0.000012
2회	-1.019884	-5.101568	0.000010
평균	-0.98157	-4.96794	0.000011

[0286] 또한, 검량직선을 얻기 위해 상기 컨택트렌즈 세정액을 2회 분취하여, 내부 표준물질과 잘 섞어서 각각 카트리지를 이용하여 전처리를 하였다. 전처리된 분석물을 다시 희석시킨 후, 1 μL씩 각각 1 spots를 로딩하였다. 또, 1000 shots씩 10번을 합하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다. 총 2개의 스펙트럼을 얻어 Σ(모든 PHMB 이온 피크의 합)/Σ(모든 ^{13}C 동위원소 치환된 PHMB 이온 피크의 합)을 통해 상대적인 ratio를 구한 다음 상용 log값을 취해 y값을 구한다. 구한 y값을 사전에 그린 검정직선을 통해 얻은 수식에 대입한다. x=log[PHMB]이므로 계산을 통해 콘택트렌즈 세정액 내에 존재하는 PHMB 함량의 상용log값을 x값으로 구할 수 있다. 따라서 콘택트렌즈 세정액 내에 존재하는 PHMB 함량은 $[PHMB]=10^{-x}$를 통해 구할 수 있다.

[0287] <실시예 9: 고체상 추출 카트리지를 이용한 화장 제거제 내의 PHMG 분석>

[0288] 실시예 7과 동일한 과정을 거쳐 분석하되, 분석대상 시료를 화장제거제로 하여 이에 포함된 PHMG 올리고머를 정량분석하였다.

[0289] 도 19는 실시예 9의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼이다. 스펙트럼의 분석 결과, ^{13}C 표지된 PHMG 외에 다른 PHMG 피크는 확인되지 않았으며, 이로 인해 화장 제거제 내의 PHMG 함량은 검출한계 이하 및 없음이 확인되었다. 여기서 레이블 된 피크 옆에 * 무늬는 사용된 내부표준물질, ^{13}C 표지된 PHMG의 피크를 나타내었다.

[0290] <실시예 10: 고체상 추출 카트리지를 이용한 화장 제거제 내의 PHMB 분석>

[0291] 실시예 9와 동일한 과정을 거쳐 분석하되, 정량분석 대상을 PHMG 올리고머 대신에 PHMB 올리고머를 분석하였다.

[0292] 도 20은 실시예 10의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼을 나타내고 있으며, 레이블 된 피크 옆에 *로 표시된 부분은 사용된 내부표준물질인 ^{13}C 표지된 PHMB이다.

[0293] 또한, 도 20의 스펙트럼의 질량값을 하기 표 14에 기재하였고, 화장 제거제 내에 존재하는 PHMB 함량분석 통계데이터를 하기 표 15에 기재하였다.

표 14

Type	n (단량체수)	질량값(m/z)
A	1	300.2
	2	483.3
B	1	325.6
C	1	342.3
F	1	367.3
G	1	377.3
H	1	384.3
A*	1	304.2
	2	489.4
B*	1	329.3
C*	1	346.3
E*	1	361.3
F*	1	371.3
H*	1	388.3

[0294]

표 15

y = 0.8026 x +3.0057

	y값 (PHMB와 내부표준물 ratio의 log 값)	x값 (PHMB농도의 log 값, g/ml)	PHMB 함량 (g/ml)
1회	0.3485111	-3.310726	0.000489
2회	0.4696161	-3.159835	0.000692
평균	0.409064	-3.23528	0.000591

[0295]

[0296] 또한, 검량직선을 얻기 위해 상기 화정 제거제를 2회 분취하여, 내부 표준물질과 잘 섞어서 각각 카트리지를 이용하여 전처리를 하였다. 전처리된 분석물을 다시 희석시킨 후, 1 μL씩 각각 1 spots를 로딩하였다. 또, 1000 shots씩 10번을 합하여 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 스펙트럼을 얻었다. 총 2개의 스펙트럼을 얻어 Σ(모든 PHMB 이온 피크의 합)/Σ(모든 ^{13}C 동위원소 치환된 PHMB 이온 피크의 합)을 통해 상대적인 ratio를 구한 다음 상용 log값을 취해 y값을 구한다. 구한 y값을 사전에 그린 검정직선을 통해 얻은 수식에 대입한다. x=log[PHMB]이므로 계산을 통해 화장제거제 내에 존재하는 PHMB 함량의 상용log값을 x값으로 구할 수 있다. 따

라서 화장제거제 내에 존재하는 PHMB 함량은 $[PHMB]=10^{-x}$를 통해 구할 수 있다.

[0297] <실시예 11: SPE 정제 방법을 이용한 혼합물 내 PGH 정성분석>

[0298] 1) 농도가 1000 ppm인 PGH 표준용액, 500 μL와 농도가 100 ppm인 PEG 표준용액, 500 μL를 함께 넣고, 잘 섞어 혼합물을 만든다.

[0299] 2) 샘플용액 1 mL에 3 mL 메탄올을 넣어 묽힌 후, 산성화를 시키기 위해 0.1% HCl/MeOH 3 μL를 가한다. 시료를 볼텍스 믹서로 1분간 잘 혼합해준다.

[0300] 3) 고체상 추출 카트리지를 이용하여 PGH를 정제를 하기 위해 MCX 카트리지(Mixed-mode Cation Exchange)의 활성화와 pre-wet 과정을 해준다. 카트리지의 활성화는 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 메탄올을 흘려준다. 1 mL씩 3번 흘려주어 카트리지의 컨디션을 잡아 준다. Pre-wet 과정은 0.1% HCl/MeOH로 카트리지의 부피의 3배, 1 cc 용량 카트리지를 사용할 경우는 3 mL의 0.1% HCl/MeOH 1 mL씩 3번 흘려주어 컨디션의 평형을 잡아준다.

[0301] 4) 평형상태의 카트리지에 전처리된 샘플을 로딩한 후, 분석하고자 하는 물질 외의 불순물을 제거하기 위해 세척 과정을 진행한다. 세척 과정은 사전에 만들어 둔 0.1% HCl/MeOH 용액을 1 mL씩 흘려 세척한다. 0.1% HCl/MeOH 용액을 카트리지 부피의 3배정도 흘려 세척하며, 불순물이 많은 경우는 세척 횟수를 조절하여 완전히 세척하는 것이 바람직하다.

[0302] 5) 세척 과정 후, 분석 물질을 카트리지 충진제와 분리시켜 용리액과 함께 용출된다. 용리액은 2 M HCl 용액을 1 mL씩 2회 흘려 시료를 완전히 용출시킨다. 그 다음, 진공회전증발기를 이용하여 용매를 완전히 건조시켜 고체상태의 샘플을 얻는다.

[0303] 6) 완전히 건조된 시료를 1 mL의 물에 녹인다. 준비된 시료의 1 μL와 매트릭스인 ILM-CHCA(이온성 액체 매트릭스) 1 μL를 잘 혼합하여, Anchor chip MALDI 플레이트에 1 μL씩 1 spot씩 로딩하여 분석한다. 시료 판을 데시케이터에 넣어 용매를 완전히 건조시킨 후, MALDI-TOF 질량분석기를 이용한다.

[0304] 도 21, 도 22는 실시예 11의 MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석 스펙트럼들로서, 보다 상세하게는, 도 21은 특정한 농도의 PGH와 PEG를 잘 혼합하여 혼합물을 만든 후, 시료를 일련의 전처리 과정 없이 바로 얻은 MALDI-TOF 질량분석스펙트럼이고, 도 22는 이 혼합물을 혼합모드 양이온 교환 카트리지를 이용하여 고체상 추출을 통한 전처리를 진행한 뒤, MALDI-TOF 질량분석기를 이용하여 얻은 질량분석스펙트럼이다.

[0305] 상기 도 21의 스펙트럼에서는 PGH와 같이 PEG가 분석되는 것을 확인 할 수 있는 반면, 도 22의 스펙트럼에서는 혼합모드 양이온 교환 카트리지를 이용한 전처리 후에는 기존의 스펙트럼과 달리 PEG의 분포가 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있다.

[0306] 도 22의 스펙트럼의 질량값을 하기 표 16에 기재하였다.

표 16

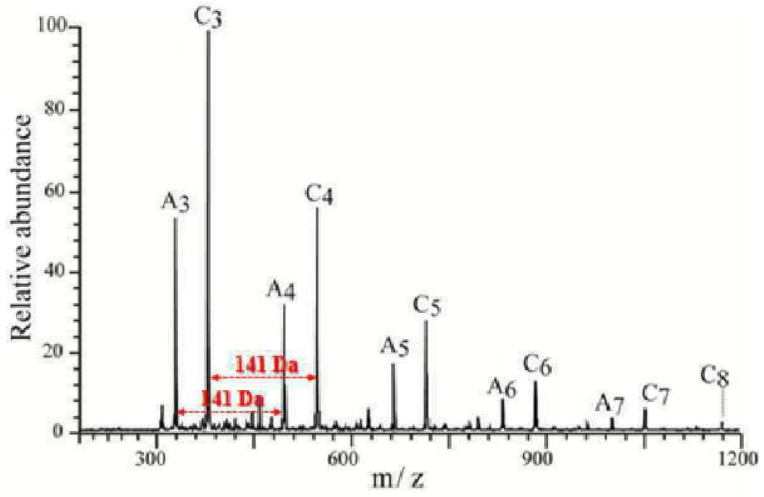
Type 이성질체 올리고머	n(단량체 수)	질량값(m/z)
A	2	348.2
	3	521.4
	4	694.5
	5	867.6
	6	1040.7
B	2	365.3
	3	538.4
	4	711.5
	5	884.6
	6	1057.7
C	2	407.3
	3	580.4
	4	753.5
	5	926.6
	6	1099.8
D	2	430.3
	3	603.4
	4	776.5
	5	949.6
	6	1122.8

[0307]

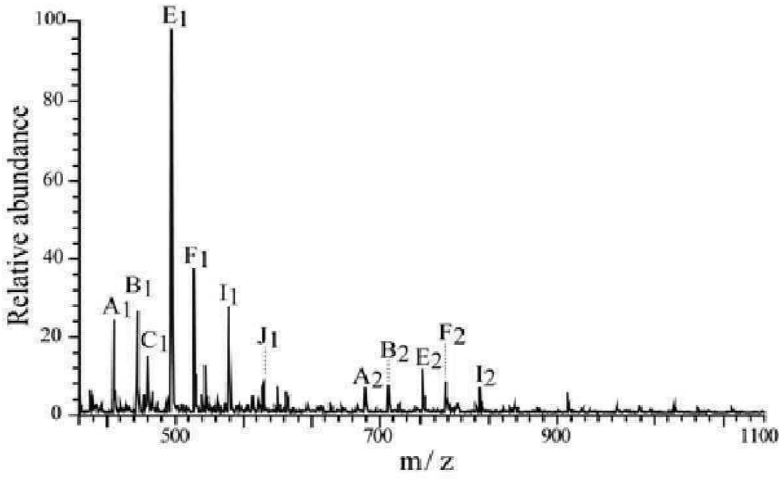
[0308] 상기 실시예 11에 따르면, PGH는 PHMG, PHMB와 같이 단량체 내에 구아니딘그룹을 가지고 있으며, 적당량의 PGH와 PEG 혼합물을 혼합모드-양이온 교환 카트리지를 통한 전처리를 통해, PEG가 제거된 것이 확인되었으며 PGH 역시 PHMG, PHMB와 같이 고체상 추출 카트리지 중 혼합모드- 양이온 교환 카트리지를 통해 다른 불순물로부터의 정제가 가능하다는 것을 보여준다.

도면

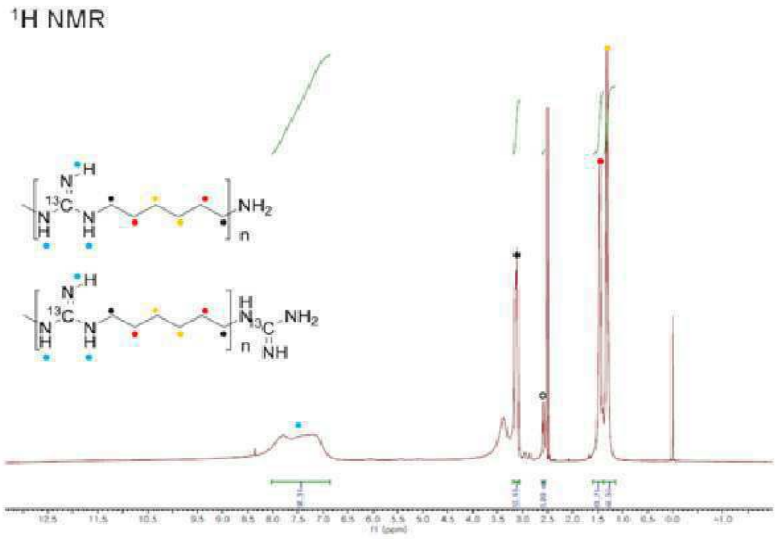
도면1



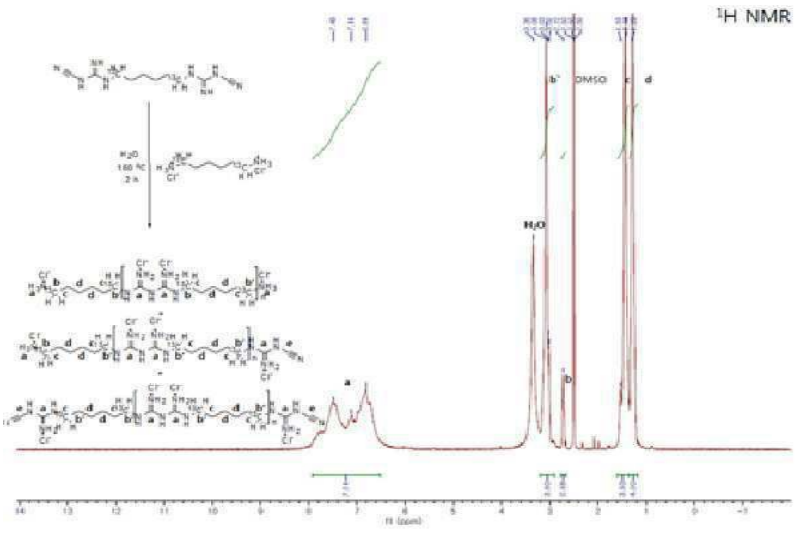
도면2



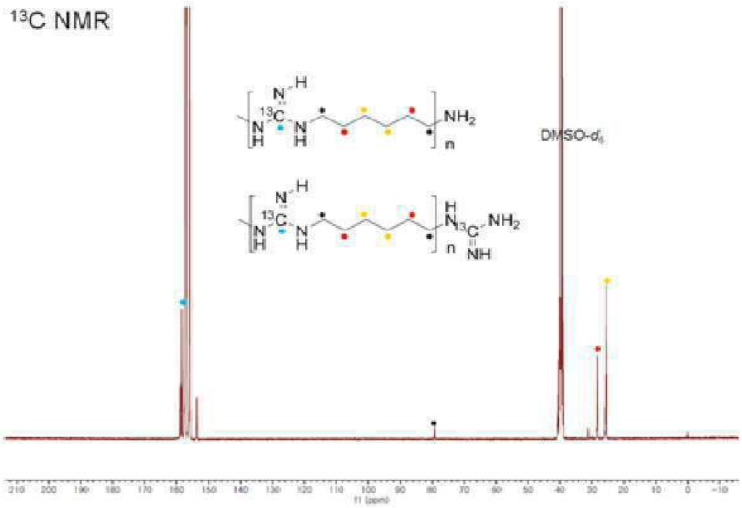
도면3



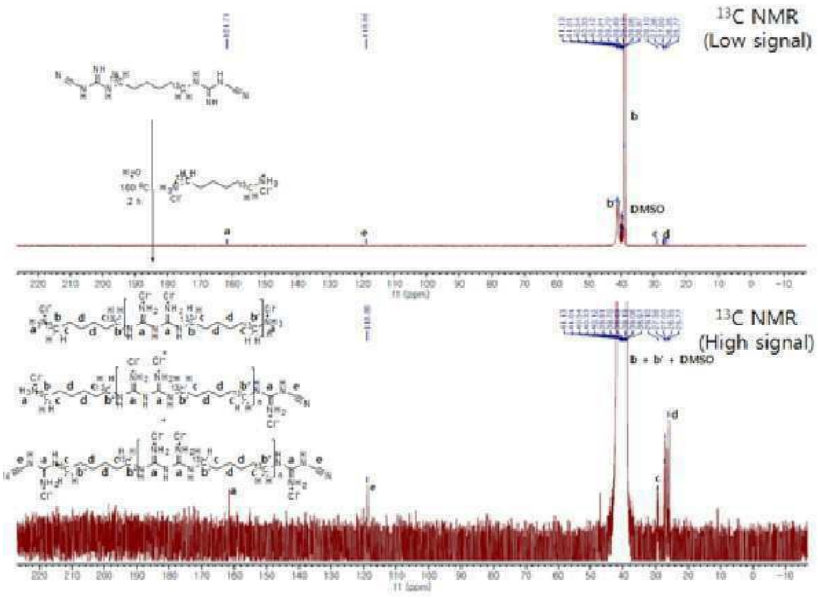
도면4



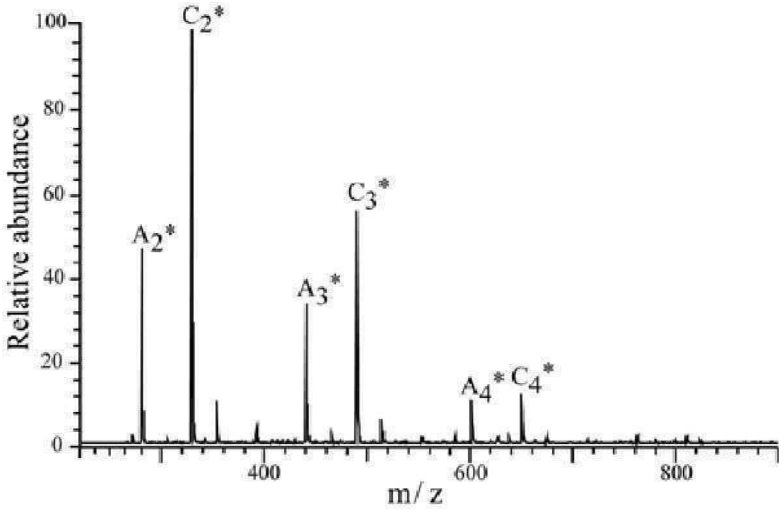
도면5



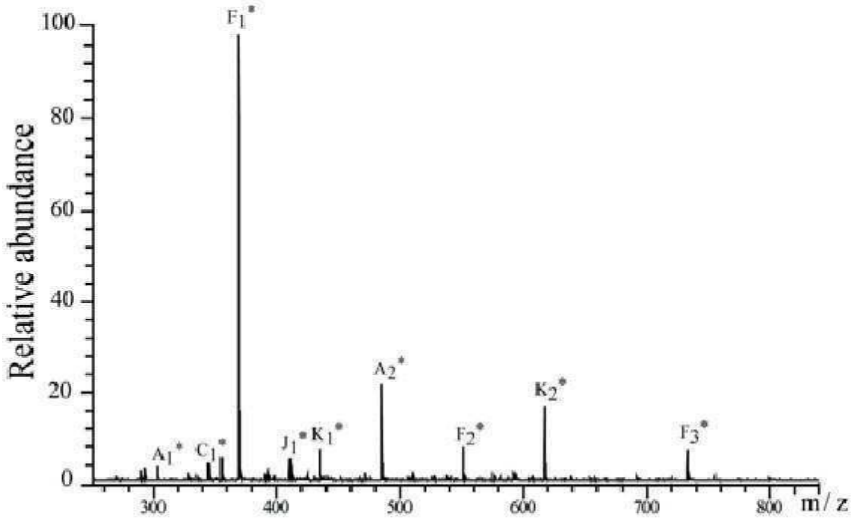
도면6


13C NMR
(Low signal)
DMSO
13C NMR
(High signal)

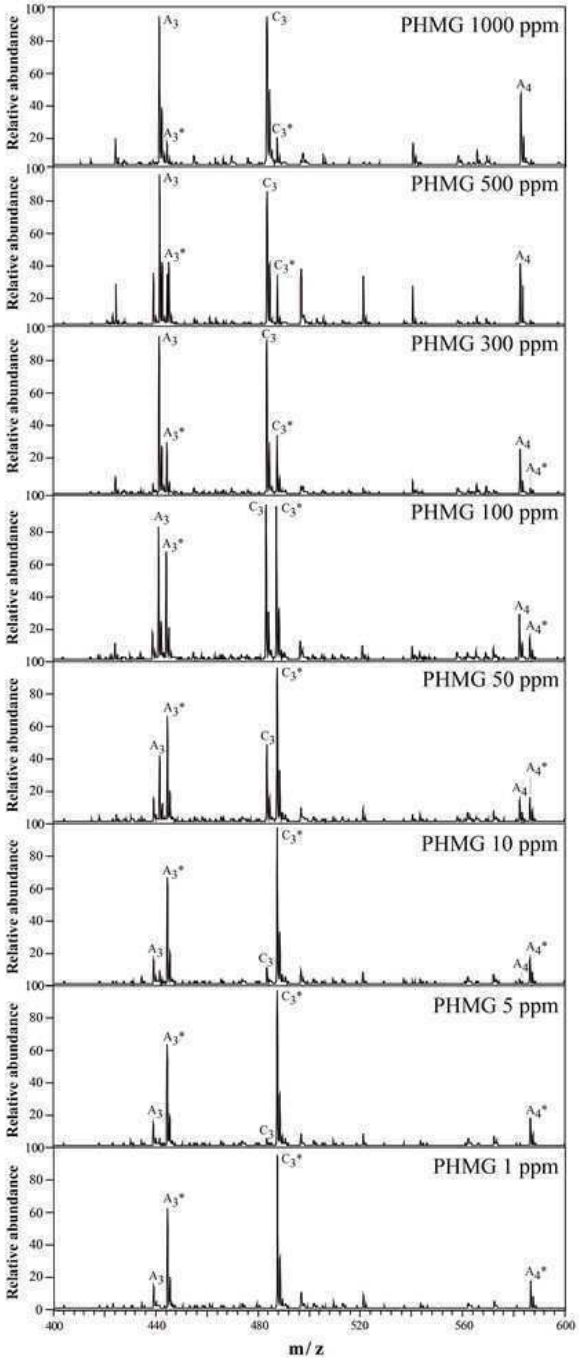
도면7


Relative abundance
m/z
C2*
C3*
A2*
A3*
A4*
C4*

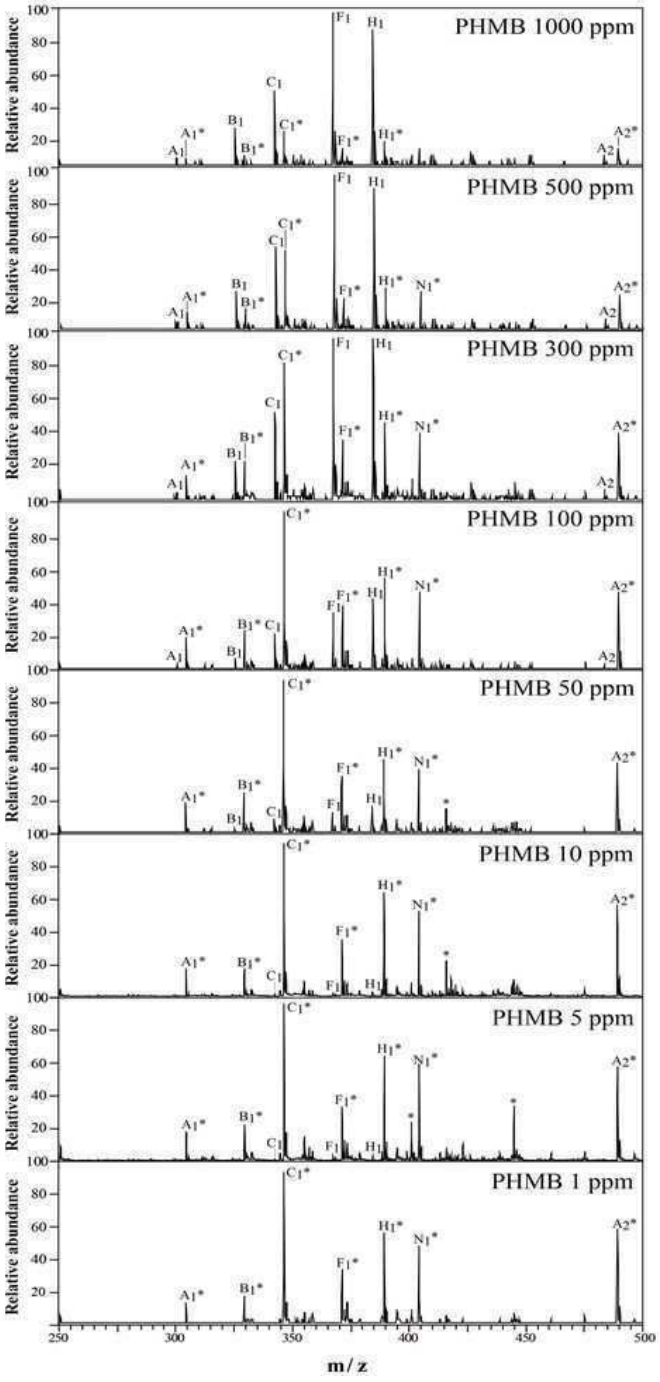
도면8


Relative abundance
100
80
60
40
20
0
300
400
500
600
700
800
m / z
F1*
A2*
K2*
F2*
F3*
A1*
C1*
J1*
K1*

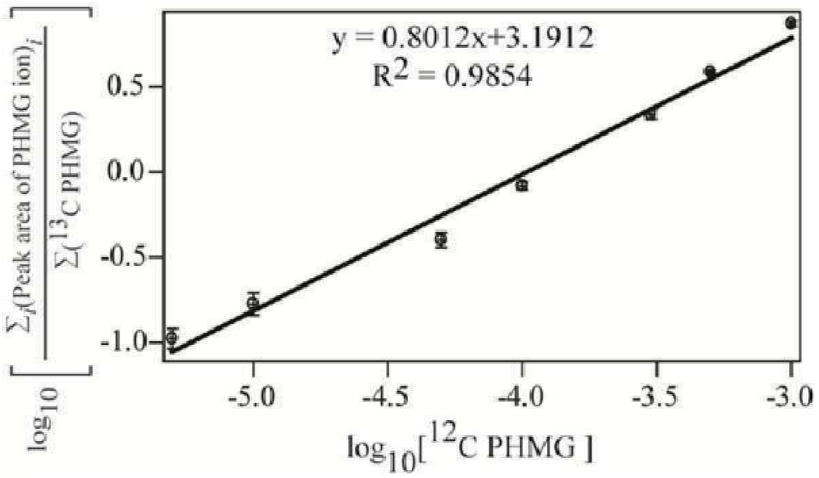
도면9


PHMG 1000 ppm
PHMG 500 ppm
PHMG 300 ppm
PHMG 100 ppm
PHMG 50 ppm
PHMG 10 ppm
PHMG 5 ppm
PHMG 1 ppm
Relative abundance
m/z
400
440
480
520
560
600

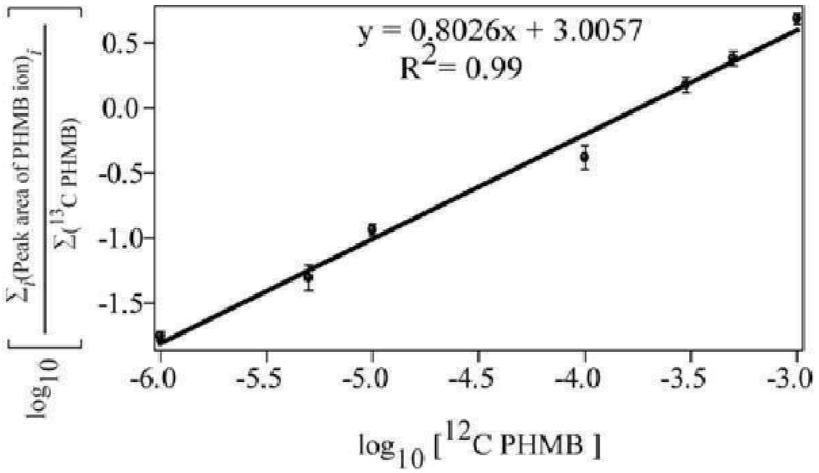
도면10


PHMB 1000 ppm
PHMB 500 ppm
PHMB 300 ppm
PHMB 100 ppm
PHMB 50 ppm
PHMB 10 ppm
PHMB 5 ppm
PHMB 1 ppm
Relative abundance
m/z

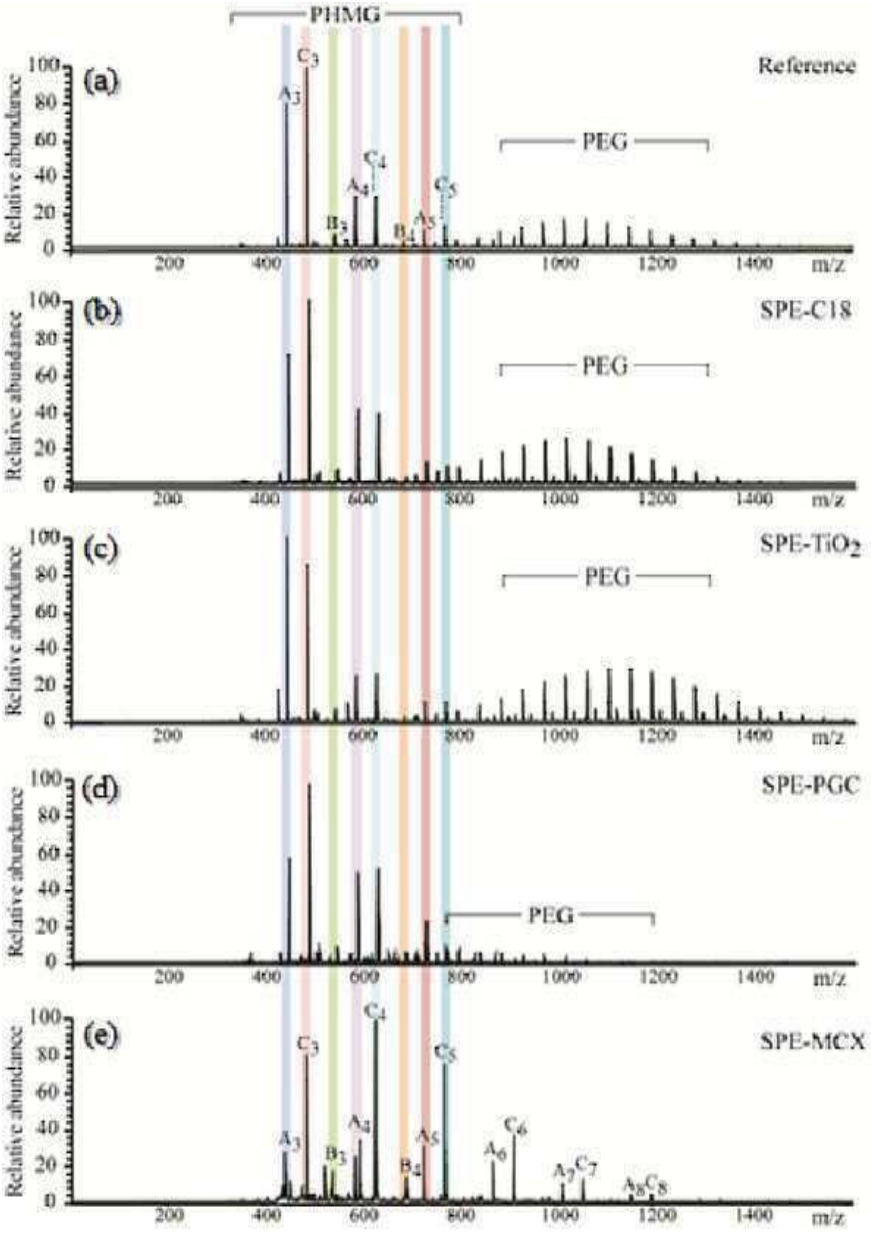
도면11


y = 0.8012x+3.1912
R2 = 0.9854
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-5.0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
log10[12C PHMG]
log10 [Σf(Peak area of PHMG ion)f / Σf(13C PHMG)]

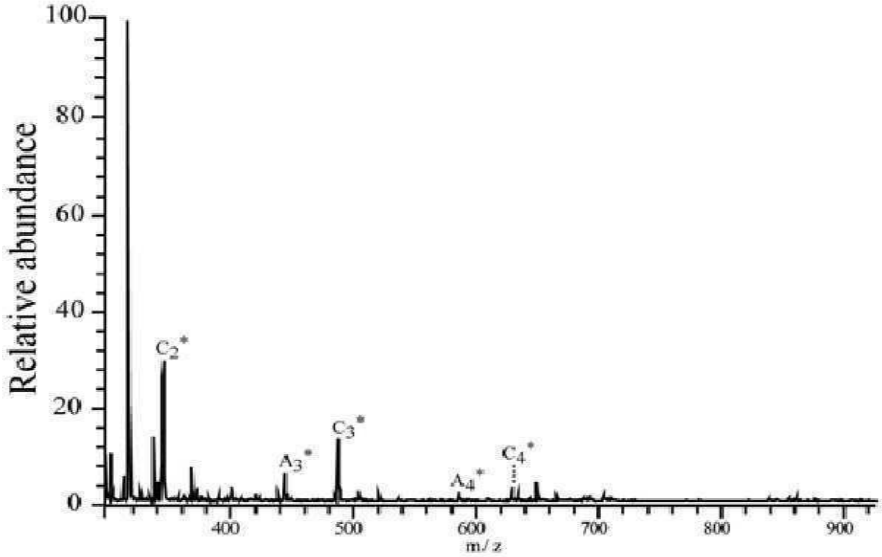
도면12


y = 0.8026x + 3.0057
R2= 0.99
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
-6.0
-5.5
-5.0
-4.5
-4.0
-3.5
-3.0
log10 [12C PHMB]
log10 [Σf(Peak area of PHMB ion)f / Σf(13C PHMB)]

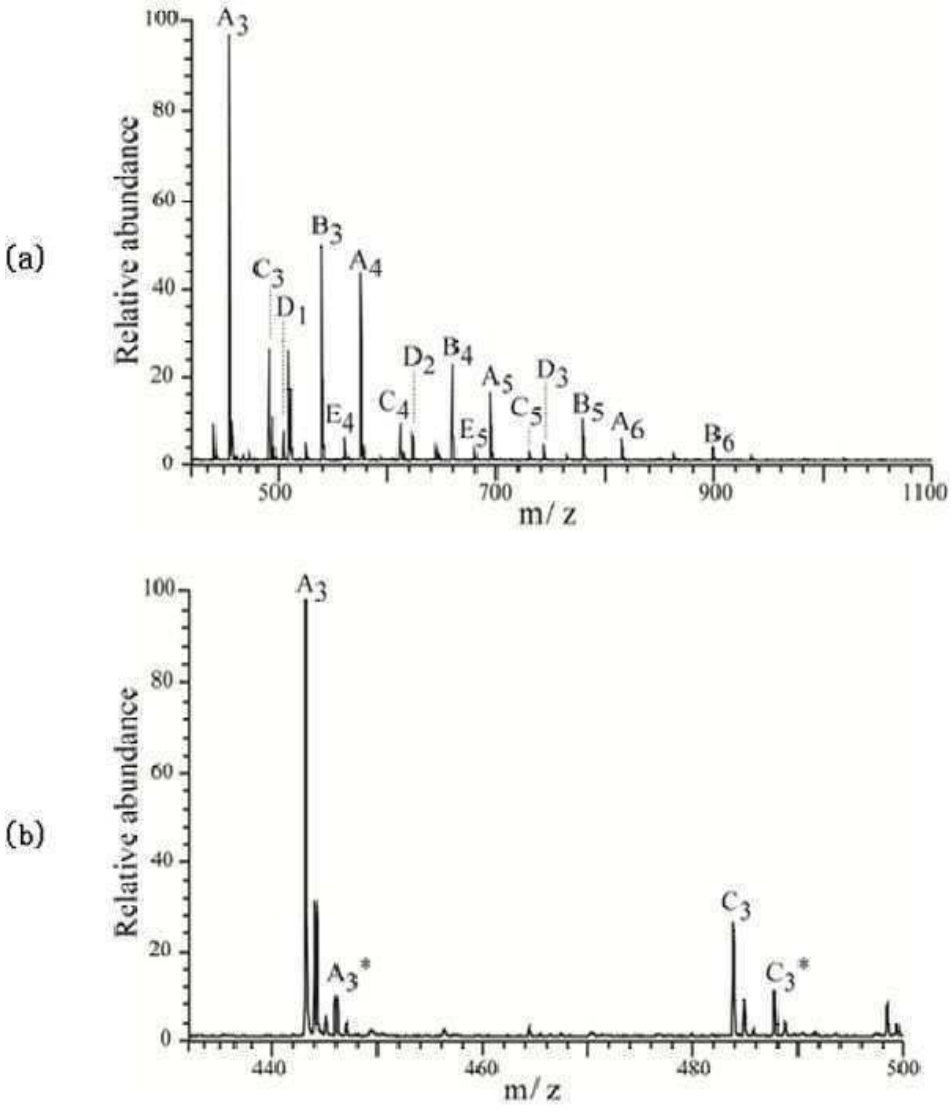
도면13


PHMG
(a)
Reference
PEG
(b)
SPE-C18
PEG
(c)
SPE-TiO2
PEG
(d)
SPE-PGC
PEG
(e)
SPE-MCX
Relative abundance
m/z

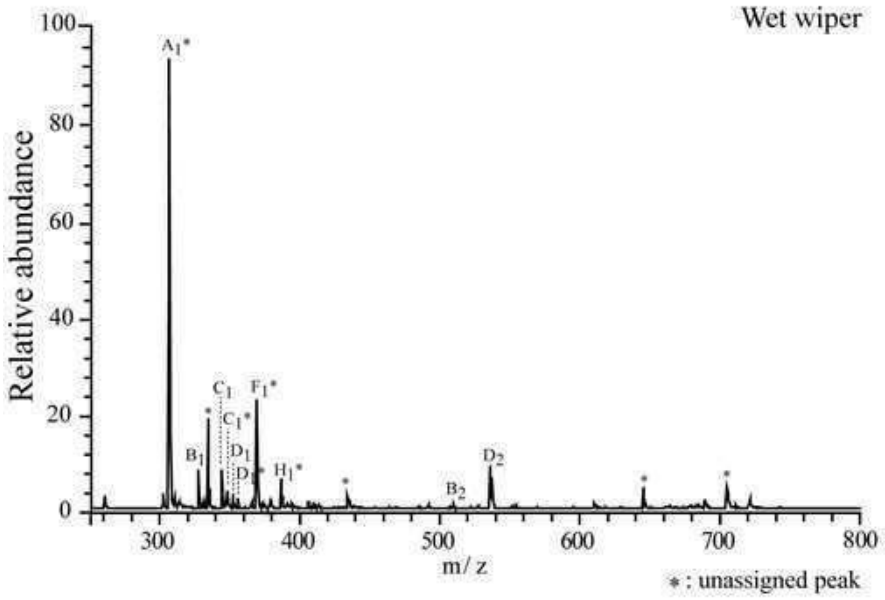
도면14


Relative abundance
m/z
C2*
A3*
C3*
A4*
C4*

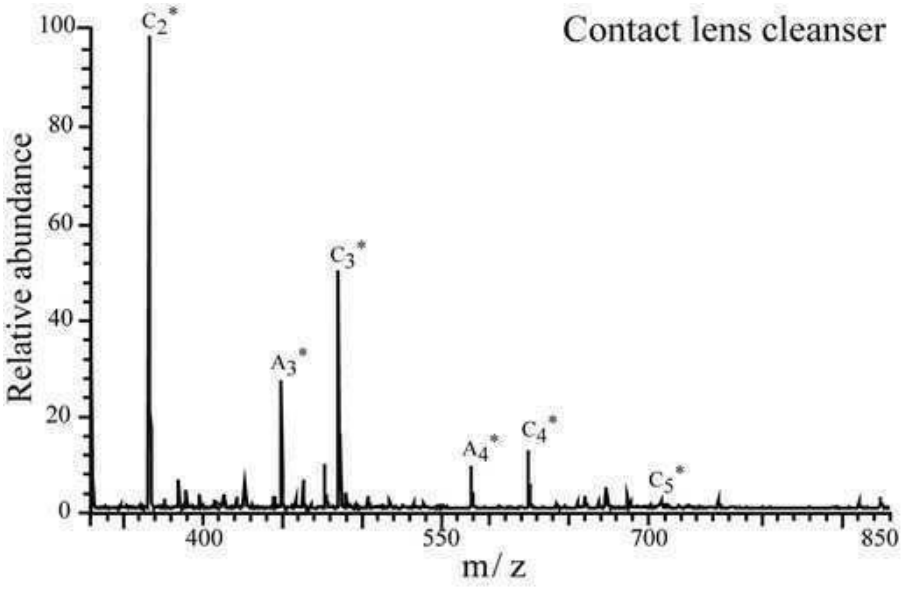
도면15


(a)
Relative abundance
m/z
A3
B3
C3
D1
A4
E4
C4
D2
B4
E5
A5
C5
D3
B5
A6
B6
(b)
Relative abundance
m/z
A3
A3*
C3
C3*

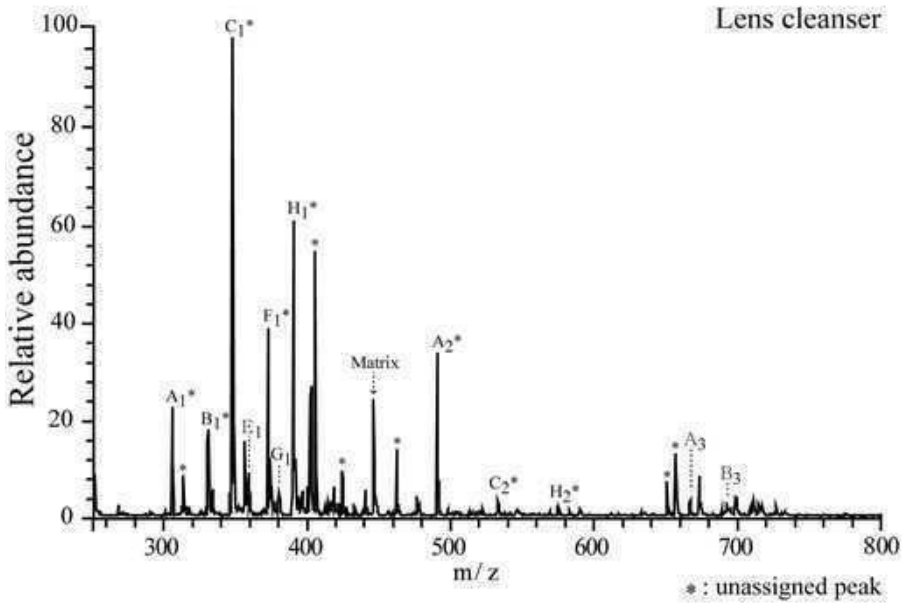
도면16


Wet wiper
Relative abundance
m/z
* : unassigned peak

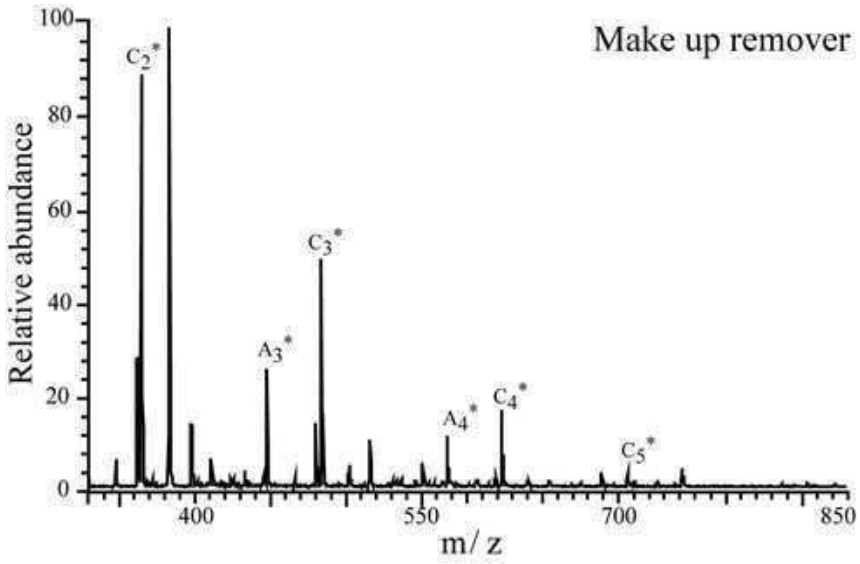
도면17


Contact lens cleanser
Relative abundance
m/z

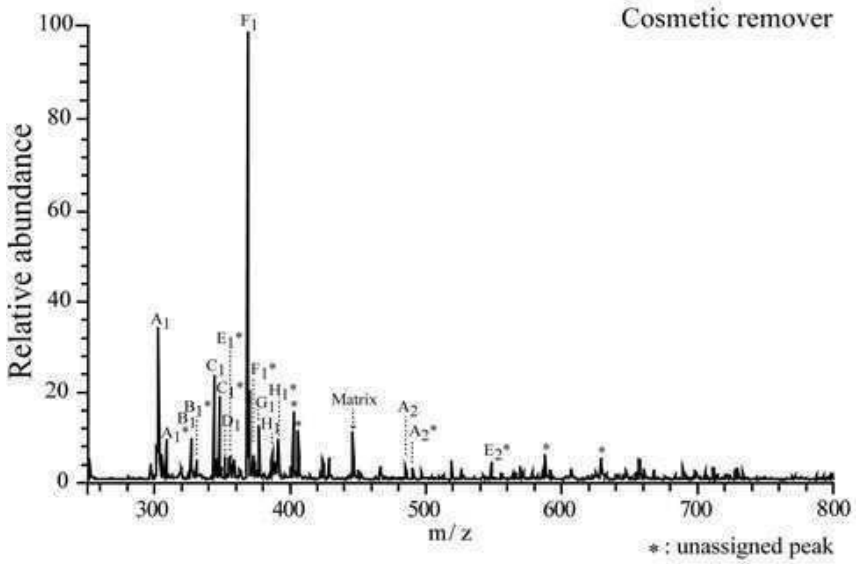
도면18


Lens cleanser
Relative abundance
m/z
* : unassigned peak
Matrix

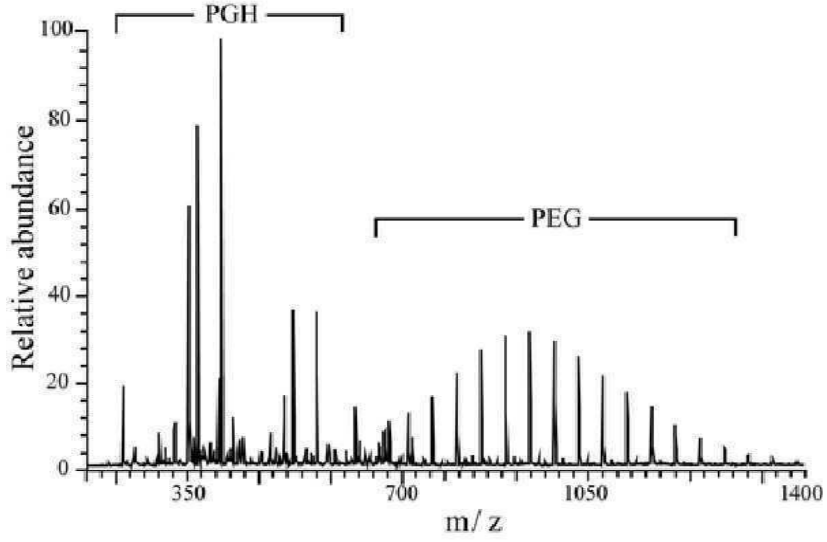
도면19


Make up remover
Relative abundance
m/z

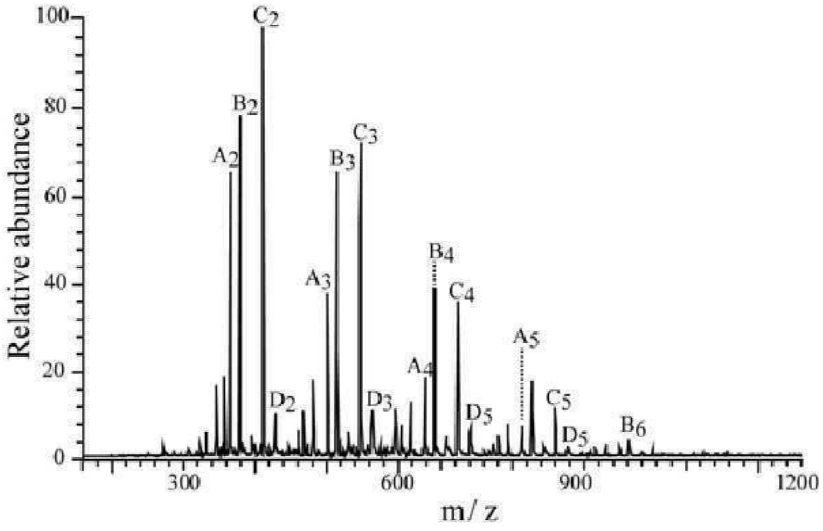
도면20


Cosmetic remover
Relative abundance
m/z
Matrix
* : unassigned peak

도면21


PGH
PEG
Relative abundance
m/z

도면22


100
80
60
40
20
0
Relative abundance
300
600
900
1200
m/z
C2
B2
A2
C3
B3
A3
B4
C4
A4
A5
C5
D2
D3
D5
D5
B6