



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0064020
(43) 공개일자 2025년05월09일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/10 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 30/10 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0147701
(22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일</p> | <p>(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
안현주
대전광역시 유성구 지족로 343, 211동 2002호 (지족동, 반석마을아파트)</p> <p>서나리
대전광역시 유성구 어은로 57, 127동 1202호 (어은동, 한빛아파트)</p> <p>(74) 대리인
강성혜</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 알긴산 추출물 내 알긴산의 순수 함량 측정법

(57) 요약

본 발명은 알긴산을 포함하는 제품 및 해조류 추출물 등에서 알긴산 추출 수율/함량과 순도를 측정하는 방법에 관한 것으로 상세하게는 만누론산(β -D-mannuronic acid, M)과 글루론산(α -L-gluronic acid, G)의 무작위적 배열로 구성된 해조 다당체인 알긴산을 단당류로 가수분해시킨 후 만누론산과 글루론산을 포함하는 해조류 구성 대

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2

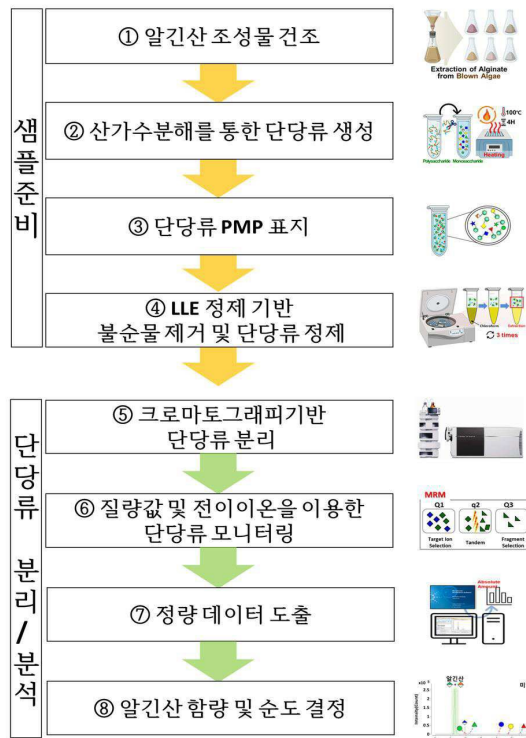


표 단당류 14종의 정량 값을 통해 알긴산 제품 또는 알긴산 추출물을 구성하는 순수 알긴산 함유량을 확인하여 알긴산의 순도를 추정하는 방법에 관한 것이다.

거대 분자량의 알긴산의 특성화 분석에 사용할 수 있는 범용 표준화 물질, 분석 도구 및 분석법이 전무하다. 본 발명은 만누론산과 굴루론산의 불규칙적 배열로 이루어진 다당체인 알긴산을 단당류 단위로 만든 후 해조류 유래 단당류를 LC/MS (Liquid Chromatography/Multiple Reaction Monitoring - Mass Spectrometry) 기반으로 정량 분석하여 알긴산의 추출 수율/함량 및 순도를 포괄적으로 확인할 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 2030/027 (2013.01)

G01N 2400/44 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 산성 조건 하에서 알긴산 조성물에 포함된 다당체를 단당류로 만드는 가수분해 단계;
- (2) 크로마토그래피를 이용한 단당류 분리와 질량분석 이온화 효율 증가를 위한 단당류 유도체화 단계;
- (3) 분석 시 방해요인이 될 수 있는 불순물 제거, 반응하지 않은 잔존 유도체화 시약 제거 및 단당류 정제를 위한 액체-액체추출 (Liquid-Liquid Extraction) 기반의 정제 단계;
- (4) 탠덤 질량분석 (Tandem MS/MS) 하에 유도체화 시약으로 표지된 14종 단당류 유래 공통이온과 특이적 이온을 선택적으로 모니터링하는 단계; 및
- (5) 만누론산과 글루론산의 정량 값으로 알긴산 추출 수율 및 알긴산 함량을 결정하는 단계;를 포함하는 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 (5) 단계 이후

- (6) 만누론산과 글루론산을 제외한 이중 단당류의 함량과 만누론산과 글루론산을 합한 알긴산 함량으로부터 알긴산 조성물의 순도를 계산하는 단계;를 더 포함하는 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 유도체화 시약은 3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP)인, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 14종 단당류는 갈락토스, 글루코스, 만노스, 자일로스, 람노스, 글루쿠론산, 갈락투론산, 퓨코스, 리보스, 아라비노스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 만누론산 및 글루론산인, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 (5) 만누론산과 글루론산의 정량 값은 추가적으로 만누론산과 글루론산을 구별하지 않고 합산된 값으로 계산하여 알긴산 추출 수율 및 알긴산 함량을 결정하는, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 (3) 단계 이후 (4) 단계 이전 역상 크로마토그래피 기반으로 유도체화 시약으로 표지된 알긴산 유래 단당류인 만누론산 및 글루론산과 유도체화 시약으로 표지된 이중 다당체 유래 단당류 12종을 분리하는 단계;를 추가하는, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법.

청구항 7

- (1) 산성 조건 하에서 알긴산 조성물에 포함된 다당체를 단당류로 만드는 가수분해 단계;
- (2) 크로마토그래피를 이용한 단당류 분리와 질량분석 이온화 효율 증가를 위한 단당류 유도체화 단계;
- (3) 불순물 제거, 반응하지 않은 잔존 유도체화 시약 제거 및 단당류 정제를 위한 액체-액체추출 (Liquid-Liquid Extraction) 기반의 정제 단계; 및
- (4) 정제된 단당류를 액체 크로마토그래피로 분리하는 단계;를 포함하는 알긴산 구성 단당류를 이중 단당류로부터 분리하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알긴산을 포함하는 제품 및 해조류 추출물 등에서 알긴산 추출 수율/함량과 순도를 측정하는 방법에 관한 것으로 상세하게는 만누론산(β -D-mannuronic acid, M)과 글루론산(α -L-gluronic acid, G)의 무작위적 배열로 구성된 해조 다당체인 알긴산을 단당류로 가수분해시킨 후 만누론산과 글루론산을 포함하는 해조류를 구성하는 대표 단당류 14종의 정량 값을 통해 알긴산 제품 또는 알긴산 추출물을 구성하는 순수 알긴산 함유량을 확인하여 알긴산의 순도를 추정하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 알긴산은 미역, 다시마 및 모자반과 같은 해조류 (갈조류)에 약 15~35% 함유되어있는 산성 점질 다당류로 250,000 Da - 350,000 Da의 거대 분자량을 가지는 고도로 당쇄화(Glycosylation) 되어 있는 세포벽 구성 물질이다.
- [0004] 알긴산은 만누론산(β -D-mannuronic acid, M)과 글루론산(α -L-gluronic acid, G)이 1, 4 글라이코시딕 결합으로 연속적으로 연결된 선형 중합체로 (도 1), 연속적인 G 잔기 (G 블록), 연속적인 M 잔기 (M 블록) 또는 불규칙한 M 및 G 잔기 (MG 블록)으로 구성될 수 있으며, M과 G의 함량에 따라 물리·화학적 성질이 달라질 수 있다.
- [0005] 미역이나 다시마 등의 해조류로부터 산 가수분해 및 열처리 공정을 통해 알긴산이 제조된다. 상세하게는 분쇄한 해조류를 황산 (H_2SO_4) 등의 강산성 용액에 침지한 뒤, 다시 탄산나트륨 (Na_2CO_3) 등 염기성 용액을 첨가하여 가열하고 교반한 다음 원심분리 후 에탄올을 추가하여 침지된 알긴산 침전물이 탈색·중화·건조과정의 단계를 거친다.
- [0006] 종래의 방법을 통해 해조류로부터 얻어지는 알긴산의 수율은 최대 16%인 것으로 보고되고 있으나, 제조과정 중에 해조류에서 함께 용출된 이중 다당체들이 포함되어있을 가능성이 높다.
- [0007] 알긴산은 증점제, 유화제, 점착제, 안정제와 같은 식품첨가물로 널리 사용되고 있고, 특유의 겔을 형성하는 특성, 가공 용이성 및 무독성 등의 장점으로 제약 성분, 치아 보형물, 화상 치료제, 조직 공학 등 의료 분야로 활용 범위가 확장되어 고부가가치 물질로 주목받고 있다.
- [0008] 고부가가치 알긴산 제품을 위한 제조공정을 개발하고 최적하기 위해서는 해조류로부터 추출된 순수 알긴산의 함량 및 순도를 확인하는 것이 필요하지만, 식품공전에도 나와 있는 알긴산을 정량하기 위한 염기성 용액과 에탄올을 이용한 침전 분석법은 알긴산 제조과정 시 유입될 수 있는 이중 다당체가 함께 포함될 수 있기 때문에 이 방법으로 얻어진 정보는 알긴산의 정확한 절대적 정량 정보로 활용되기 어렵다.
- [0009] 더욱이 의료용으로 알긴산의 활용 범위가 확대됨에 따라 함량 및 순도에 관한 정보가 요구되고 있으나, WHO에 기술된 지침과 식품공전 시험법이 동일하기 때문에 알긴산 품질 확인을 위한 새로운 분석법과 기준이 필요한 상

항이다.

[0011] [알긴산 함량 및 순도 분석법의 필요성]

[0012] 시중에 판매되는 유명 기업의 고가의 의료용 알긴산 표준품의 경우 알긴산의 용해 정도, 점성 및 특수 주파수 영역에서 나타나는 특이적 분자 진동에 흡수 스펙트럼을 측정하는 적외선 분광법 (FT-IR)을 통해 도출된 만누론산 (β -d-mannuronic acid, M)과 글루론산 (α -L-guluronic acid, G)의 비율로만 특성이 제시되고 있어, 고부가가치 제품으로 활용하기 위한 알긴산의 절대적 지표인 함량과 순도에 관한 지침 및 규정이 필요하다.

[0013] 일반용과 의약품용 알긴산의 확인 시험법은 동일하다. 식품의약품안전처 식품첨가물 공전 (식품의약품안전처 고시 제2023-29호(2023.04.28., 개정))에 기술되어 있는 알긴산 시험법은 수산화나트륨 (NaOH) 용액과 에탄올을 가할 때 생기는 침전물로 알긴산을 정의하고, 침전물의 건조 중량으로 함량을 확인하는데 머물러 있으며, 제조 공정 중에 해조류로부터 함께 용출된 이종 다당체들이 포함되어 순수 알긴산만의 함량 결과를 제공할 수 없다.

[0014] 특성화된 표준품이 없는 다당체인 알긴산의 함량을 확인하는 분석법이 부재하고, 대안으로 제시될 수 있는 해조류 유래 알긴산 추출물을 단당류로 만들고 해조류를 구성하는 단당류들을 동시 분석하는 표준화된 방법은 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명자들은 거대 분자량의 알긴산 분석을 위해 사용할 수 있는 범용된 표준화된 물질, 분석 도구 및 분석법이 없는 한계점을 해결하기 위해, 알긴산 제품 및 해조류 유래 알긴산 추출물에 포함되어있는 다당체를 단당류 단위로 만들어 알긴산을 구성하는 2종 단당류를 포함하는 해조 단당류 대표 14종의 LC/MRM-MS 기반 정량 분석을 통해 순수 알긴산의 추출 수율/함량 및 순도를 추정하는 방법을 발명하였다.

[0017] 따라서, 본 발명은 고부가가치 제품으로 활용될 수 있는 알긴산의 함량과 순도 결정을 통해 알긴산에 대한 올바른 정보를 제공하고, 알긴산을 포함하는 고품질 의료용 제품을 생산할 수 있는 기반을 마련하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명자들은 알긴산 추출물 및/또는 알긴산 제품의 순수 알긴산 함량 및 순도를 결정하기 위해 알긴산 조성물을 산 가수분해한 다음 LC/MRM-MS 기반의 동시 분석법으로 해조류 대표 14개의 단당류를 개별적으로 정량하여 알긴산 추출 수율/함량과 순도를 측정하는 분석법을 발명하였다 (도 2).

[0021] 본 발명은 알긴산 조성물로부터 단당류를 준비하고, LC-MRM/MS 기반 단당류 정량 데이터 도출을 통한 함량 및 순도를 결정하는 과정을 포함한다.

[0022] 구체적으로 본 발명은

[0023] (1) 산성 조건 하에서 알긴산 조성물에 포함된 다당체를 단당류로 만드는 가수분해 단계;

[0024] (2) 크로마토그래피를 이용한 단당류 분리와 질량분석 이온화 효율 증가를 위한 단당류 유도체화 단계;

[0025] (3) 분석 시 방해요인이 될 수 있는 불순물 제거, 반응하지 않은 잔존 유도체화 시약 제거 및 단당류 정제를 위한 액체-액체추출 (Liquid-Liquid Extraction) 기반의 정제 단계;

[0026] (4) 탠덤 질량분석 (Tandem MS/MS) 하에 유도체화 시약으로 표지된 14종 단당류 유래 공통이온과 특이적 이온을 선택적으로 모니터링하는 단계; 및

[0027] (5) 만누론산과 글루론산의 정량 값으로 알긴산 추출 수율 및 알긴산 함량을 결정하는 단계;를 포함하는 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.

- [0028] 또한, 본 발명은 상기 (5) 단계 이후
- [0029] (6) 만누론산과 글루론산을 제외한 이종 단당류의 함량과 만누론산과 글루론산을 합한 알긴산 함량으로부터 알긴산 조성물의 순도를 계산하는 단계;를 더 포함하는 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명에서 상기 유도체화 시약은 특별한 제한이 없으나, 바람직하게는 3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolone (PMP)인, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 14종 단당류가 갈락토스, 글루코스, 만노스, 자일로스, 람노스, 글루쿠론산, 갈락투론산, 퓨코스, 리보스, 아라비노스, N-아세틸글루코사민, N-아세틸갈락토사민, 만누론산 및 글루론산인, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 (5) 만누론산과 글루론산의 정량 값은 추가적으로 만누론산과 글루론산을 구별하지 않고 합산된 값으로 계산하여 알긴산 추출 수율 및 알긴산 함량을 결정하는, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 (3) 단계 이후 (4) 단계 이전 역상 크로마토그래피 기반으로 유도체화 시약으로 표시된 알긴산 유래 단당류인 만누론산 및 글루론산과 유도체화 시약으로 표시된 이종 다당체 유래 단당류 12종을 분리하는 단계;를 추가하는, 알긴산 함량 또는 수율 분석 방법에 관한 것이다.
- [0034] 또한, 본 발명은
- [0035] (1) 산성 조건 하에서 알긴산 조성물에 포함된 다당체를 단당류로 만드는 가수분해 단계;
- [0036] (2) 크로마토그래피를 이용한 단당류 분리와 질량분석 이온화 효율 증가를 위한 단당류 유도체화 단계;
- [0037] (3) 불순물 제거, 반응하지 않은 잔존 유도체화 시약 제거 및 단당류 정제를 위한 액체-액체추출 (Liquid-Liquid Extraction) 기반의 정제 단계; 및
- [0038] (4) 정제된 단당류를 액체 크로마토그래피로 분리하는 단계;를 포함하는 알긴산 구성 단당류를 이종 단당류로부터 분리하는 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명에 따르면, 종래 침전물의 청량으로 얻어졌던 간접적인 알긴산 정량 방법을 대체하여 알긴산 추출 수율 및 불순물 (이종 다당체) 존재 여부에 대한 정보를 포괄적으로 제공할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따르면, 거대 다당체인 알긴산 특성분석을 위해 사용할 수 있는 표준품, 분석 도구 및 표준화된 분석 방법이 부족한 상황에서 단당류의 측정으로 알긴산 제품 및 추출액의 순수 알긴산 함량을 정확하게 얻을 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 다당체를 산 가수분해하여 얻어진 만누론산과 글루론산을 포함하는 대표 해조 단당류 14종의 동시 정량을 위한 시료 제조방법, PMP 표지 및 불순물의 제거, LC/MRM-MS 분석을 포함한 전반적인 워크플로우를 제공한다.
- [0043] 또한, 본 발명은 알긴산에 국한되지 않고 해조류 유래 다당류에 존재하는 대표 단당류 14종을 결정함으로써 알긴산 이외의 푸코이단 등 다른 종류의 해조류 다당체의 정량 분석에도 활용할 수 있는 확장성이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 알긴산의 구조 정보이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 흐름도이다.
- 도 3은 해조류 유래 대표 14종 단당류 표준품을 분리 분석한 크로마토그램이다.
- 도 4는 실제 판매 중인 알긴산 제품 및 미역으로부터 추출된 알긴산 조성물에 대해 본 발명의 방법을 적용하여 도출된 크로마토그램의 결과의 예시이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 아래에서는 구체적인 실시예와 실험예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예, 실험예에 기재된 범위로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0048] **[산 가수분해를 통한 다당체 알긴산을 단당류 단위로 전환하는 단계]**
- [0049] 1. 알긴산 시료 50 μg 에 200 μL 2M TFA (trifluoroacetic acid)를 넣고 heating block에서 99 $^{\circ}\text{C}$, 350 rpm으로 4시간 동안 반응시켜 가수분해를 진행하였다.
- [0050] 2. 가수분해가 완료된 시료에 800 μL 3차 증류수를 넣은 후 진공 농축기에서 건조하였다.
- [0052] **[단당류의 크로마토그래피 분리와 질량분석 이온화 효율 증가를 위한 PMP 표지 단계]**
- [0053] 1. 상기 진공농축기에서 건조된 시료에 50 μL 3차 증류수와 200 μL 0.2 M PMP-MeOH, 200 μL 28% 암모니아수를 넣고 heating block에서 70 $^{\circ}\text{C}$ 로 30분 동안 PMP 표지 반응시켰다.
- [0054] 2. 반응 완료된 시료는 빛을 차단한 상태로 진공 농축기에서 건조하였다.
- [0056] **[액체-액체 추출을 이용한 불순물 및 과량의 표지 시약 제거 및 단당류 정제 단계]**
- [0057] 1. 건조된 시료에 500 μL 3차 증류수와 500 μL 클로로포름을 넣고 액체-액체추출 (Liquid Liquid Extraction, LLE)하여 증류수 층에 있는 PMP 표지된 단당류를 포함하는 상층액만 채취하였다.
- [0058] 2. 채취한 상층액에 클로로포름 500 μL 를 추가 주입하여 액체-액체 추출을 진행한 다음 상층액만 다시 채취하였다.
- [0059] 3. 채취한 상층액에 클로로포름 500 μL 를 추가 주입하여 액체-액체추출을 진행 후 상층액만 다시 채취하였다.
- [0060] 4. 채취한 상층액을 2 μL 취해 증류수로 100배 희석하여 LC/MRM-MS로 분석하였다.
- [0062] **[LC/MRM-MS을 이용한 14종 단당류의 분리 분석 단계]**
- [0063] 1. PMP 유도체화된 단당류들의 정량을 위해 UHPLC/QqQ MS를 이용한 MRM 기법으로 분리 및 분석을 수행하였다.
- [0064] 2. UHPLC/QqQ MS에 시료 2 μL 를 로딩한 후, 빠른 용출 농도구배 용액을 분당 0.3 μL 씩 흘려주었다.
- [0065] 3. 단당류 분리를 위해 2.1 $\times$ 100 mm 분석 컬럼의 1.8 μm C18 정지상이 패킹된 컬럼을 사용하였다.
- [0066] 4. 용매 A는 25mM 초산암모늄이 5% 아세트나이트릴과 200 μL 28% 암모니아수에 용해된 완충액이며, 용매 B는 95% 아세트나이트릴 완충액이다. 기울기 용매조건은 다음과 같다: 14.5% B, 0~10 min; 14.5~99% B, 10~10.5 min; 99% B, 10.5~15.5 min; 99~12% B, 15.5~16 min; 12% B, 16~21 min.
- [0067] 5. C18 기반의 액체크로마토그래피에서 극성도가 높은 hexuronic acid 계열의 만누론산과 글루론산이 2분 안에 용출된 후 이중 단당류가 순차적으로 분리되어 1차적으로 알긴산 유래 단당류와 이중 다당체 유래 단당류를 분류하였다.
- [0068] 6. 액체 크로마토그래피로 분리된 PMP 표지된 단당류들을 이후 사중극자 질량분석기 (QqQ-MS)의 첫 번째 4중극자 (quadrupole; Q1)에서 해당되는 이온을 선택하고 충돌 셀 (collision cell 즉, q2)에서 선택된 분자에 특정한 에너지를 가하여 단편화 (fragmentation)하여 조각 이온 (fragment ion)이 생성된 다음 세 번째 4중극자 (Q3)에서는 충돌 셀에서 생성된 단편 중 선택된 이온만을 통과시켜 검출하는 단계로 MRM-MS 분석을 수행하였다 (표 3).

[0070] [표준품의 크로마토그램과 비교를 통한 14종 당당류의 정량 데이터 도출 단계]

[0071] 1. 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도 범위의 14종 당당류 표준품과 시험 대상 알긴산 조성물로부터 위와 같은 방법으로 PMP 처리된 샘플을 각각 LC/MRM-MS로 분석하였다.

[0072] 2. 표준품의 분석을 통해 도출된 크로마토그램의 면적 값을 알긴산 유래 당당류 크로마토그램의 면적 값과 비교하여 알긴산 농도를 도출하였다. 이때, 동일한 머무름 시간에 용출된 알긴산 유래 만누론산과 글루론산을 추가로 구분하지 않고 합산된 값을 사용하여 알긴산 총 함량 계산 시 데이터 처리의 용이성과 신속성을 확보하였다.

[0074] [만누론산과 글루론산 정량 값으로 추출 수율/함량 및 순도 결정 단계]

[0075] 1. 다음 식에 대입하여 원료 물질에 함유된 순수 알긴산의 함량 및 순도를 확인하였다.

[0076] ■ 알긴산의 함량 (μg) = 시험 용액 중 만누론산과 글루론산의 농도 ($\mu\text{g/mL}$) $\times$ {시험용액의 전량 (mL) $\times$ 회석 배수}

[0077] ■ 알긴산의 순도 (%) = 만누론산과 글루론산의 농도 / (만누론산과 글루론산의 농도 + 이종 당당류의 농도) $\times$ 100

[0078] 표 1은 각 해조류에 포함된 다당체와 이를 구성하는 당당류를 나타낸다. 갈조류 다당류의 일종인 알긴산 (Alginic acid)은 만누론산과 글루론산으로만 이루어져 있다.

표 1

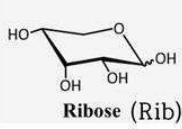
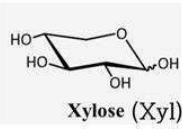
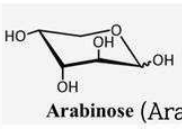
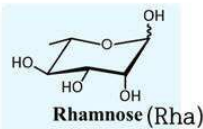
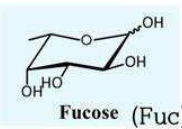
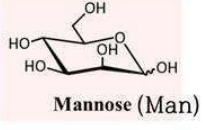
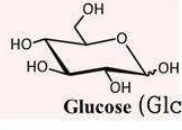
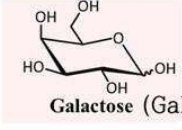
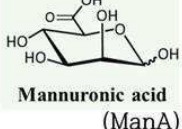
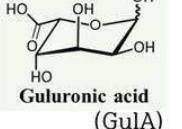
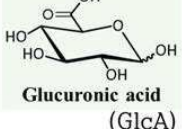
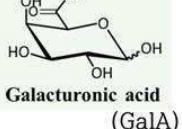
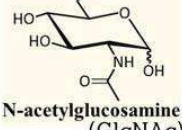
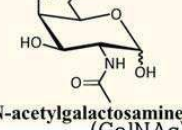
해조류 종류	다당체	단당류
적조류	Agar	Galactose
		Glucose
	Carrageenan	Galactose
	Agaropectin	Galactose
		Glucose
	Cellulose	Glucose
	Xylans	Xylose
	Mannans	Mannose
녹조류	Ulvan	Rhamnose
		Xylose
		Glucose
		Mannose
		Glucuronic acid
	Starch	Glucose
	Xylopyranose	Xylose
	Glucopyranose	Glucose
	Xyloglucan	Glucose
		Xylose
	Glucuronan	Glucuronic acid
갈조류	Cellulose	Glucose
	Fucoidan	Fucose
	Laminaran	Glucose
	Alginates	Mannuronic acid
		Guluronic acid
	Cellulose	Glucose

[0079]

[0081]

표 2는 상기 해조류를 구성하는 단당류를 유사한 구조끼리 나열한 것이다. 해조류를 구성하는 단당류들은 분자량이 동일하고 매우 유사한 화학 구조를 가지는 이성질체가 많아 지금까지 정확한 분석이 어려웠다.

표 2

Pentose 150.13g/mol	 Ribose (Rib)	 Xylose (Xyl)	 Arabinose (Ara)	
Deoxyhexose 164.1565g/mol	 Rhamnose (Rha)	 Fucose (Fuc)		
Hexose 180.156g/mol	 Mannose (Man)	 Glucose (Glc)	 Galactose (Gal)	
Hexuronic acid 194.139g/mol	 Mannuronic acid (ManA)	 Guluronic acid (GulA)	 Glucuronic acid (GlcA)	 Galacturonic acid (GalA)
N-acetyl-hexosamine 221.21g/mol	 N-acetylglucosamine (GlcNAc)	 N-acetylgalactosamine (GalNAc)		

[0082]

[0084]

표 3은 표 2에서 분리한 다섯 가지 단당류 군에 속하는 각 단당류들을 본 발명의 방법으로 텐덤 질량분석한 결과, 얻어진 머무름 시간 (Retention time), 전구체 이온, 산물 이온, 충돌 에너지를 나타낸다.

[0085]

표 3으로부터 알긴산을 구성하는 단당류인 만누론산과 굴루론산이 동일한 머무름 시간을 나타냄을 확인할 수 있다. 추가적으로 본 발명에서 단당류 정량을 위해 LC/MRM-MS 분석 시 사용한 조건들을 나열하였다.

표 3

Monosaccharides	Name	Retention time (RT)	Precursor ion [M+H] ⁺	Product ions		Collision energy (eV)
				Qualifier	Quantifier	
Hexuronic acid	ManA + GulA	1.27	525.1	217.1	175.1	25
	GlcA	1.98	525.1	217.1	175.1	25
	GalA	2.28	525.1	217.1	175.1	25
Hexose	Man	2.02	511.1	217.1	175.1	25
	Glc	4.19	511.1	217.1	175.1	25
	Gal	4.78	511.1	217.1	175.1	25
Pentose	Rib	2.32	481.1	217.1	175.1	25
	Xyl	4.79	481.1	217.1	175.1	25
	Ara	5.09	481.1	217.1	175.1	25
Deoxyhexose	Rha	2.54	495.1	217.1	175.1	25
	Fuc	5.59	495.1	217.1	175.1	25
N-acetyl-hexosamine	GlcNAc	3.11	510.1	216.1	175.1	30
	GalNAc	5.6	510.1	216.1	175.1	30

[0086]

[0088] 아래 표 4는 알긴산 표준품과 갈조류인 미역으로부터 추출한 알긴산 추출액을 시료로 하여 본 발명의 방법으로 각 당류의 함량과 순도를 확인한 결과이다. 알긴산 표준품에는 알긴산 외에도 글루코스, 갈락토스, 푸코스, 자일로스, 글루쿠론산, 람노스 등이 함유되어 있었다. 미역에서 추출한 알긴산 추출액에서도 푸코스, 글루쿠론산, 갈락토스, 글루코스 자일로스 등의 당류가 함유되어 있었다.

[0089] 본 발명의 방법에 따르면 시판되는 알긴산 제품뿐만 아니라, 해조류에서 얻은 알긴산 추출액에서도 알긴산의 함량, 순도를 정확하고 빠르게 분석할 수 있다. 나아가, 본 발명의 방법은 알긴산 이외에 특이적 당류로 구성되어 있는 푸코이단 등의 해조류 유래 다른 다당류의 분석, 정량, 순도 결정에도 적용 가능하다.

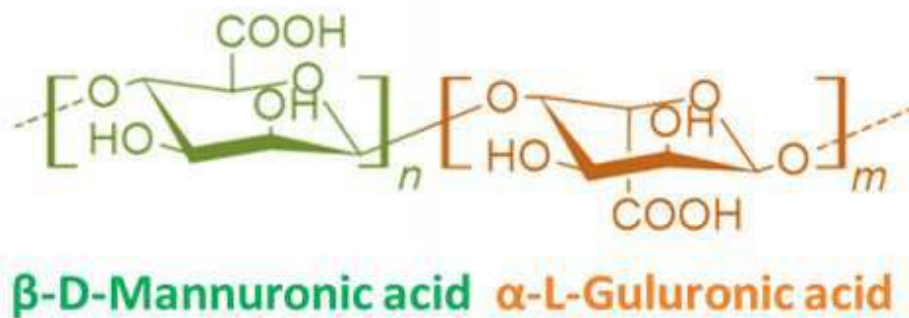
표 4

	알긴산 표준품		알긴산 추출액 (미역)	
	ng/μg	SD	ng/μg	SD
Mannose	—	—	0.40	0.00
Glucose	1.70	0.50	2.70	0.50
Galactose	1.70	0.00	4.70	0.00
N-acetylglucosamine	—	—	—	—
N-acetylgalactosamine	—	—	—	—
Rhamnose	0.10	0.00	0.10	0.00
Fucose	3.90	0.10	9.80	0.10
Ribose	0.30	0.00	0.10	0.00
Xylose	1.40	0.10	2.00	0.10
Arabinose	0.50	0.20	0.50	0.10
Glucuronic acid	67.70	1.10	43.40	1.30
Galacturonic acid	—	—	—	—
Mannuronic acid Gluronic acid	183.10	6.60	152.50	7.30
알긴산 함량 (μg/50μg)	9.20		7.60	
알긴산 순도 (%)	70.30		70.30	

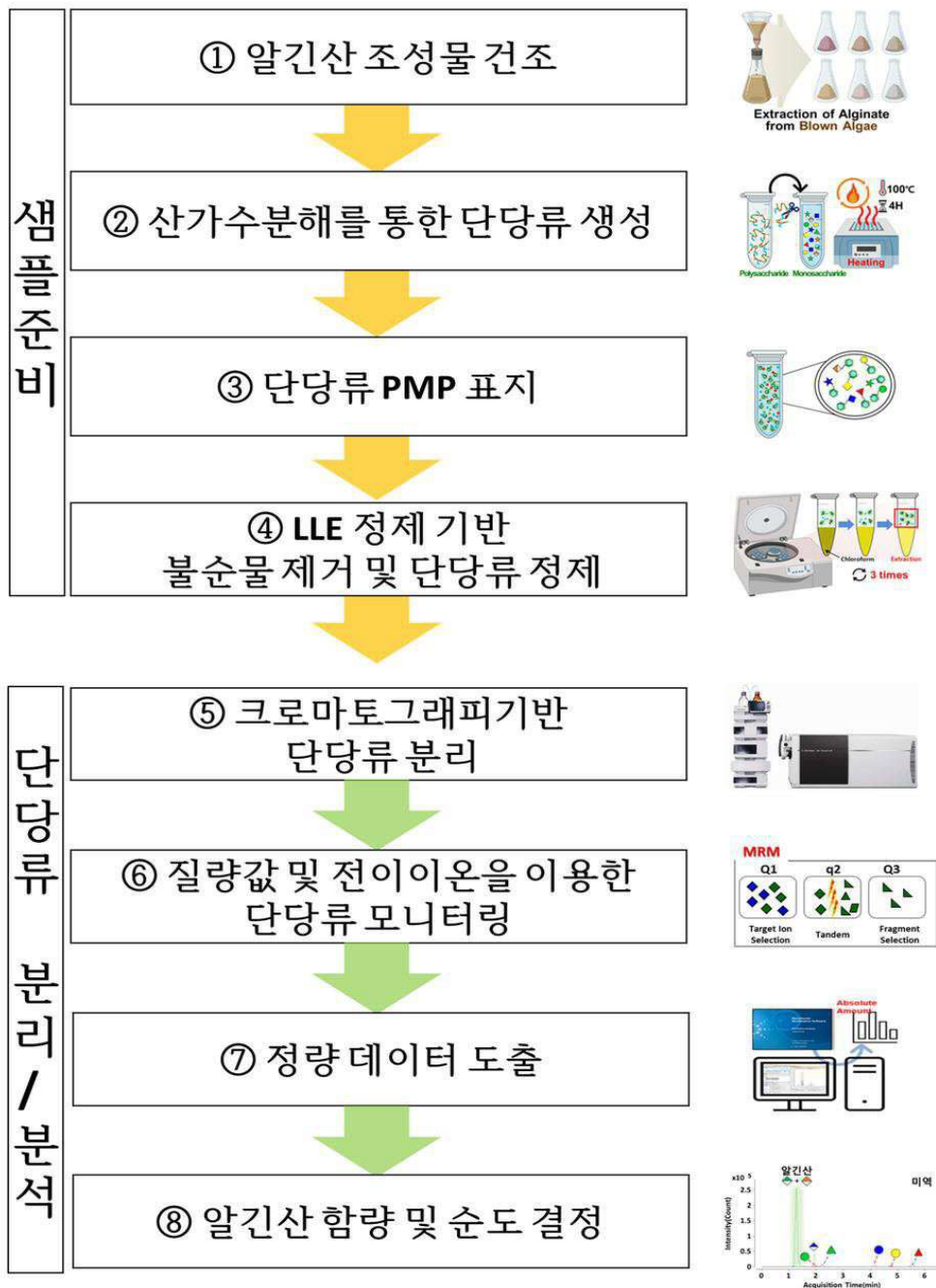
[0090]

도면

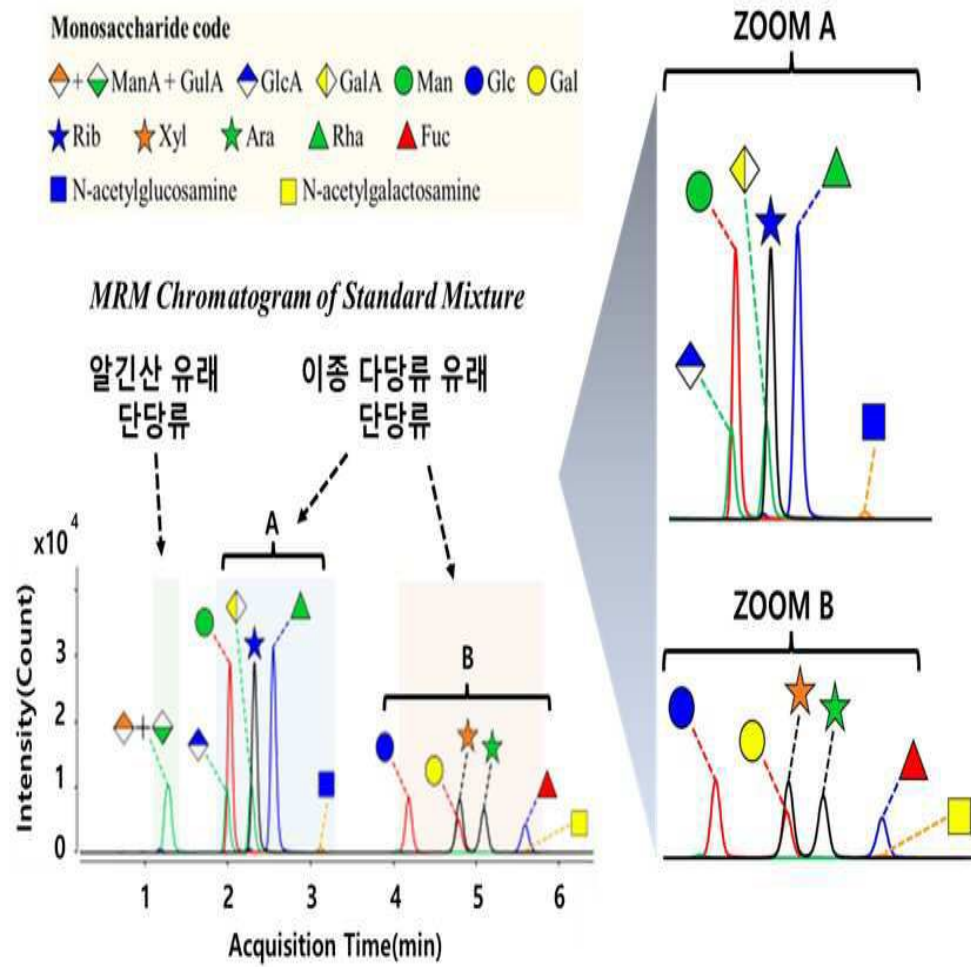
도면1



도면2



도면3



도면4

