

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0070638

(43) 공개일자 2020년06월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 27/62 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 27/62 (2013.01)

G01N 33/6851 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0157986

(22) 출원일자 2018년12월10일

심사청구일자 2018년12월10일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

변재철

서울특별시 서초구 잠원로 46-38, 101동 301호(잠원동, 브라운스톤잠원)

(74) 대리인

김권석

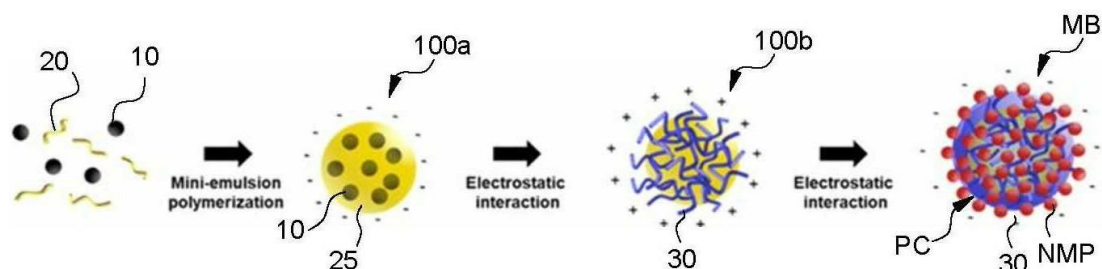
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 피분석 물질의 농축과 말디툼 질량 분석을 위한 이온화가 가능한 자성 비드, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 질량 분석 방법

(57) 요약

본 발명의 다양한 실시예에 따른 자성 비드, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 질량 분석 방법이 개시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드는, 샘플 내 피분석 물질의 농축과 말디툼(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분석용 매트릭스를 겸용하는 자성 비드이며, 자성을 갖는 코어부; 및 상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자들 또는 나노 금속 섬들을 포함한다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10063335

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업핵심기술개발사업

연구과제명 나노기술 기반 생체 저분자물질 정량 표면 질량분석 플랫폼 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국표준과학연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B4004077

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 대장균 표면발현 항체-라이브러리를 이용한 의료진단용 모노크로날 항체개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

샘플 내 피분석 물질의 농축과 말디툼(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분석용 매트릭스를 겸용하는 자성 비드로서,

자성을 갖는 코어부; 및

상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자들 또는 나노 금속 섬들을 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 코어부는 상자성체를 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 코어부는,

상기 자성을 갖는 나노 1차 입자들; 및

상기 나노 1차 자성 입자들을 분산 고정하고, 2 차 입자를 형성하는 중합체 매트릭스를 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 중합체 매트릭스는 폴리스타일렌을 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 코어부는, 상기 중합체 매트릭스 상에 양전하 표면층을 형성하는 전하 조절제를 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 전하 조절제는 폴리라이신을 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 전하 조절제는 상기 중합체 매트릭스의 표면에 측쇄 결합하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 나노 금속 입자들이 상기 전하 조절제에 결합하여 상기 자성 비드의 표면층의 하전 극성이 역전되는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 피분석 물질은 양전하로 하전된 물질 또는 황화수소기(-SH)를 포함하는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 피분석 물질은 약 200 Da (Daltons) 내지 20,000 Da의 범위 내의 분자량을 갖는 질량 분석용 자성 비드.

청구항 11

샘플 내 피분석 물질의 농축과 말디툼(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분석용 매트릭스를 검용하는 자성 비드의 제조 방법으로서,

자성을 갖는 코어부를 제공하는 단계; 및

상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자들 또는 나노 금속 섬들을 형성하는 단계를 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 코어부는 상자성체를 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서,

상기 코어부를 제공하는 단계는,

상기 자성을 갖는 나노 1차 입자들과 상기 중합체 매트릭스의 모너머 및 저분자량 물질을 혼합하는 단계; 및

상기 모너머 및 저분자량 물질을 중합시켜 상기 나노 1차 입자들을 상기 중합체 매트릭스 내에 분산 고정시키는 단계를 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 중합체 매트릭스는 폴리스타일렌을 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서,

상기 코어부를 제공하는 단계는, 상기 중합체 매트릭스와 전하 조절제를 반응시켜 상기 코어부에 양전하 표면층을 형성하는 단계를 더 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서,

상기 전하 조절제는 폴리라이신을 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 17

제 15 항에 있어서,

상기 전하 조절제는 상기 중합체 매트릭스의 표면에 측쇄 결합하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 18

제 15 항에 있어서,

상기 나노 금속 입자들이 상기 전하 조절제에 결합하여 상기 자성 비드의 양전하 표면층의 하전 극성이 음으로 역전되는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 19

제 11 항에 있어서,

상기 피분석 물질은 양전하로 하전된 물질 또는 황화수소기(-SH)를 포함하는 질량 분석용 자성 비드의 제조 방법.

청구항 20

제 1 항 기재의 자성 비드를 샘플 내에 첨가하는 단계;

상기 자성 비드를 샘플 내에서 유동시켜 상기 자성 비드의 표면 상에 상기 피분석 물질을 농축시키는 단계;

외부 자기장을 이용하여 상기 피분석 물질이 농축된 자성 비드를 수집하는 단계;

기관 상에 상기 피분석 물질이 농축된 자성 비드를 적치시켜 샘플 플레이트를 제공하는 단계; 및

상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 말디툼 질량 분석을 수행하는 질량 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 말디툼 질량 분석 기술에 관한 것이며, 더욱 상세하게는 자성 비드, 이의 제조 방법, 및 이를 이용한 질량 분석 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 질량 분석 기기는 피분석 물질의 질량을 측정하는 장치로서, 상기 피분석 물질을 이온화하여 하전시킨 후 질량 대 전하량(mass-to-charge: m/z)을 측정하여 혼합 하전된 이온들의 분자량을 결정하게 된다. 상기 피분석 물질의 이온화는 유기 매트릭스를 상기 피분석 물질과 혼합한 후 레이저를 조사하여 진행한다. 상기 유기 매트릭스는 자외선 영역의 레이저 에너지를 흡수하여 활성화되는 과정에서 상기 피분석 물질을 이온화시킬 수 있다.

[0003] 말디툼 질량 분석(MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectroscopy)의 이온화 방법은 일반적으로 피분석 물질에 +1 또는 +2 와 같은 간단한 이온화도를 일으키며 단백질 등의 고분자 물질의 경우에도 체인의 분해로 인한 파편화가 일어나지 않으므로 전체 분자 대의 분자량의 측정에 적용이 가능하다. 상기 말디툼 질량 분석은 피분석 물질의 준비가 간단하지만 고감도 측정이 가능하며 넓은 분석 범위를 가져 이를 이용하는 것은 많은 이점을 갖는다. 그러나, 상기 말디툼 질량 분석은 저분자량의 피분석 물질의 경우에는 분자량의 측정이 용이하지 않은 단점이 있다. 이와 같은 문제점은 샘플의 이온화를 위해 사용하는 유기 매트릭스 분자가 레이저의 조사에 의해 이온화되면서 동시에 분자 구조가 파편화되어 저분자량 영역에서 유기 매트릭스로부터 파생된 물질로 인한 노이즈가 발생하기 때문이다. 상기 저분자량의 피분석 물질은 질량 분석 피크가 상기 유기 매트릭스에 의한 노이즈와 겹치는 경우 이의 분석이 불가능하게 된다.

[0004] 따라서, 수백 Da의 분자량을 갖는 저분자량의 피분석 물질을 질량 분석하기 위한 새로운 매트릭스와 이에 의한 질량 분석 방법의 개발은 바람직하다. 특히, 이온화가 어려운 저분자량 물질로서, 면역 억제제를 질량 분석하기 위해, 이를 효과적으로 이온화하고 노이즈를 억제할 수 있는 새로운 매트릭스는 바람직하다. 또한, 예를 들면, 면역 억제제와 같이 피분석 물질이 체액 샘플 내에 극미량 존재하는 경우 유효한 분석을 위해서는 배양이나 농축과 같은 질량 분석 이전의 샘플 준비 과정에 많은 시간이 소요된다. 따라서, 극미량의 피분석 물질을 준비하는 과정을 단순화하여 소요 시간을 단축하는 것은 효율적인 질량 분석을 위하여 바람직하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 피분석 물질의 농도가 매우 낮은 샘플에서 상기 피분석 물질을 선택적으로 결합시켜 농축시킬 수 있으며, 동시에 저분자량의 피분석 물질을 질량 분석하기 위해 저분자량 영역에서의 노이즈 문제없이 피분석 물질을 이온화하는 매트릭스로서 기능하는 질량 분석용 구조체를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는 전술한 질량 분석용 구조체의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는 전술한 질량 분석용 구조체를 이용한 질량 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 질량 분석용 구조체는, 샘플 내 피분석 물질의 농축과 말디툼(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분석용 매트릭스를 겸용하는 자성 비드이다. 상기 자성 비드는, 자성을 갖는 코어부; 및 상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자들 또는 나노 금속 섬들을 포함한다.
- [0009] 상기 코어부는 상자성체를 포함할 수 있다. 상기 코어부는, 상기 자성을 갖는 나노 1차 입자들; 및 상기 나노 1차 자성 입자들을 분산 고정하고, 2 차 입자를 형성하는 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 중합체 매트릭스는 폴리스타일렌을 포함할 수 있다.
- [0010] 상기 코어부는, 상기 중합체 매트릭스 상에 양전하 표면층을 형성하는 전하 조절제를 포함할 수 있다. 상기 전하 조절제는 폴리라이신을 포함할 수 있다. 상기 전하 조절제는 상기 중합체 매트릭스의 표면에 측쇄 결합하는 화합물로부터 선택될 수 있다.
- [0011] 일 실시예에서, 상기 나노 금속 입자들이 상기 전하 조절제에 결합하여 상기 자성 비드의 표면층의 하전 극성이 역전될 수 있다. 상기 피분석 물질은 양전하로 하전된 물질 또는 황화수소기(-SH)를 포함할 수 있다. 상기 피분석 물질은 약 200 Da (Daltons) 내지 20,000 Da의 범위 내의 분자량을 가질 수 있다.
- [0012] 상기 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따라ms 자성 비드의 제조 방법은, 샘플 내 피분석 물질의 농축과 말디툼(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight; MALDI-TOF) 질량 분석용 매트릭스를 겸용하는 자성 비드의 제조 방법이다. 상기 자성 비드의 제조 방법은, 자성을 갖는 코어부를 제공하는 단계; 및 상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자들 또는 나노 금속 섬들을 형성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 코어부는 상자성체를 포함할 수 있다. 상기 코어부를 제공하는 단계는, 상기 자성을 갖는 나노 1차 입자들과 상기 중합체 매트릭스의 모너머 및 저분자량 물질을 혼합하는 단계; 및 상기 모너머 및 저분자량 물질을 중합시켜 상기 나노 1차 입자들을 상기 중합체 매트릭스 내에 분산 고정시키는 단계를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 중합체 매트릭스는 폴리스타일렌을 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 코어부를 제공하는 단계는, 상기 중합체 매트릭스와 전하 조절제를 반응시켜 상기 코어부에 양전하 표면층을 형성하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 전하 조절제는 폴리라이신을 포함할 수 있다. 상기 전하 조절제는 상기 중합체 매트릭스의 표면에 측쇄 결합하는 화합물을 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 나노 금속 입자들이 상기 전하 조절제에 결합하여 상기 자성 비드의 양전하 표면층의 하전 극성이 음으로 역전될 수 있다. 상기 피분석 물질은 양전하로 하전된 물질 또는 황화수소기(-SH)를 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 질량 분석 방법은, 상기 자성 비드를 샘플 내에 첨가하는 단계; 상기 자성 비드를 샘플 내에서 유동시켜 상기 자성 비드의 표면에 상기 피분석 물질을 농축시키는 단계; 외부 자기장을 이용하여 상기 피분석 물질이 농축된 자성 비드를 수집하는 단계; 기판 상에 상기 피분석 물질이 농축된 자성 비드를 적치시켜 샘플 플레이트를 제공하는 단계; 및 상기 자성 비드에 레이저를 조사하여 말디툼 질량 분석을 수행하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 실시예에 따른 자성을 갖는 코어부 및 상기 코어부 상에 결합되고 음전하 표면층을 형성하는 나노 금속 입자 또는 나노 금속 섬들을 포함하는 자성 비드는, 피분석 물질이 극미량 포함된 샘플 내에 분산된 상태에

서 또는 가변적인 자기장을 이용하여 유동하는 상태에서, 상기 표면층의 하전 상태와 상기 나노 금속 입자 또는 나노 금속 섬들을 이용하여 피분석 물질을 선택적으로 결합시켜 피분석 물질을 표면 상에 효과적으로 농축할 수 있으며, 이를 자기장을 이용하여 수득하고, 이를 그대로 질량 분석을 위한 샘플 플레이트로 이용하여 타겟에 배치함으로써, 추가적인 유기 매트릭스의 처리없이도 표면에 흡착된 피분석 물질을 이온화하는 매트릭스 기능이 제공될 수 있다. 또한, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드는 종래의 유기 매트릭스와 달리, 저분자량 영역에서도 노이즈를 발생시키지 않기 때문에 저분자량의 피분석 물질을 정밀하게 질량 분석할 수 있는 고체 매트릭스 기능이 제공될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따르면, 전술한 피분석 물질의 농축과 질량 분석용 매트릭스를 겸용하는 자성 비드를 이용함으로써, 샘플 플레이트의 준비 과정이 단순화되고 저분자량의 영역에서도 정밀한 측정이 가능한 말디툼 질량 분석 방법이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드 및 이의 제조 방법을 도시하며, 도 1b 내지 도 1d는 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 전자 현미경 이미지들이며, 도 1e는 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 평균 크기를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 표면 전하 값을 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 이용한 피분석 물질의 농축과 말디툼 질량 분석을 위한 샘플 플레이트를 도시한다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드와 비교예로서 α -시아노(ciano)-4-하이드록시시나믹산(hydroxycinnamic) (이하, CHCA라 함)을 각각 고체 매트릭스로 사용하여 아미노산을 말디툼 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로 사용하여 다양한 아미노산들을 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로서 사용하여 아미노산의 혼합물을 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 이용한, 양전하를 가진 펩티드인 GHP9(G_1 -H-P-Q- G_2 -K₁-K₂-K₃-K₄, 1006.59 Da)의 농축 전후의 자성 비드의 표면 전하의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로 이용하여 양전하를 가진 펩티드 GHP9를 농축 후 질량 분석한 결과와 종래의 유기 매트릭스(CHCA)를 이용하여 펩티드 GHP9를 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노 금 입자가 코팅된 자성 비드(Au-MAG)를 이용하여 티오글리콜산나트륨(Sodium thioglycolate)를 농축 후 질량 분석한 결과와 비교예에 따른 유기 매트릭스(CHCA)를 이용한 티오글리콜산나트륨을 질량 분석한 결과를 비교하여 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 이용하여 메치오닌(Methionone)을 농축 후 상기 자성 비드를 고체 매트릭스로서 이용하여 메치오닌을 분석한 결과와 비교예에 따른 유기 매트릭스(CHCA)를 이용하여 메치오닌을 질량 분석한 결과를 비교하여 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 실시예를 통하여 나노 금속 입자가 표면에 결합된 기능성 자성 비드를 이용하여, 샘플 내 미량으로 존재하는 면역 억제제와 같은 양전하를 가진 피분석 물질이나 황화수소기를 가진 피분석 물질을 선택적으로 흡착시켜 피분석 물질을 효과적으로 샘플 내에서 농축시킬 수 있고, 상기 자성 비드를 고체 매트릭스로서 이용하여 추가적인 유기 매트릭스의 도움 없이도 피분석 물질의 이온화가 효과적으로 이루어져 신뢰성있는 질량 분석이 가능함을 시연하고자 한다.

[0021] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드(MB) 및 이의 제조 방법을 도시하며, 도 1b 내지 도 1d는 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 전자 현미경 이미지들이며, 도 1e는 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 평균

크기를 나타내는 그래프이다.

- [0022] 도 1a를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드(MB)는 자성을 갖는 코어부(PC) 및 코어부(PC) 상에 결합되는 나노 금속 입자들(NMP)을 포함할 수 있다. 나노 금속 입자들(NMP)은, 도 1a에 도시된 것과 같이 구형에 한정되는 것은 아니며, 다각 입체 현상이나 디스크 형상을 가질 수 있다. 다른 실시예에서는 나노 금속 입자들(NMP) 대신에, 또는 나노 금속 입자들(NMP)과 함께 나노 금속 섬들(미도시)이 제공될 수도 있다. 상기 나노 금속 섬들은 코어부(PC) 상에 나노 두께의 금속 박막을 증착하고, 코어부(PC)를 열적 손상시키지 않는 온도 범위에서 열처리를 하여 상기 금속 박막을 적어도 부분 용융시켜 이의 유동성을 확보함으로써 응집 과정을 통해 고립된 섬들이 형성되면서 제공될 수도 있다.
- [0023] 나노 금속 입자들(NMP) 및 상기 나노 금속 섬들은 이를 지지하는 코어부(PC)와 전기적으로 상호 작용을 통하여 코어부(PC)에 결합되고, 자성 비드(MB)에 음전하 표면층을 제공할 수 있다. 예를 들면, 나노 금속 입자들은 코어부(PC)의 양전하 표면층과 전기적인 상호 작용을 통하여 자성 비드(MB)의 표면을 음으로 하전시킬 수 있다.
- [0024] 일 실시예에서, 자성을 갖는 코어부(PC)는, 상자성체일 수 있다. 이 경우, 코어부(PC)는 외부 자기장이 존재할 때만 자화될 수 있으며, 외부 자기장이 제거되면 자성을 잃을 수 있다. 상자성 코어부(PC)에 의해 자성 비드(MB)는 자성을 갖게 되며, 외부 자기장이 제거되면 자성 비드(MB)는 유동할 수 있게 된다. 코어부(PC)가 강자성체일 수도 있지만, 강한 강자성체인 경우에는 자성 비드들(MB)이 서로 자기적 인력에 의해 응집되어 후술하는 도 4에 나타난 바와 같이 샘플(300) 내에서 자성 비드들(MB)이 균일하게 분산되지 못하게 되며, 그에 따라 피분석 물질(AS)의 효과적 농축이 방해될 수도 있다.
- [0025] 일 실시예에서, 자성을 갖는 코어부(PC)는 자성을 갖는 나노 1차 입자들(10)과 상기 나노 1차 입자들을 분산 고정하여 2 차 입자(100a)를 형성하는 중합체 매트릭스(25)를 포함할 수 있다. 중합체 매트릭스(25)는 2 차 입자(100a)의 바디를 형성하는 구조체이며, 상기 중합체 매트릭스(25) 내에 나노 1차 입자들(10)이 균일하게 분산될 수 있다.
- [0026] 일 실시예에서, 나노 1차 입자들(10)은, 자성 결정체 또는 자성 비정질체일 수 있다. 예를 들면, 나노 1차 입자들(10)은 철, 코발트, 니켈, 크롬, 망간 및 바나듐 중 적어도 어느 하나의 금속, 상기 금속의 산화물, 상기 금속의 질화물을 포함할 수 있다. 선택적으로는, 나노 1차 입자들(10)은 상기 자성 결정체나 자성 비정질체에 비자성 금속, 예를 들면 구리(Cu), 알루미늄(Al), 실리콘(Si), 또는 티타늄(Ti)이 도핑되거나 합금화될 수 있다. 예를 들면, 상기 나노 1차 입자(10)로서, 철 산화물은, 금속 염의 산화·환원 반응을 이용하여 형성될 수 있다. 예를 들면, 철을 함유하는 6.4 mmol의 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 3.2 mmol의 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 을 물에 녹인 후 소정 온도, 예를 들면 80 °C 에서 30분간 질소분위기에서 가열한 후, 약 5 M 농도의 10.4 mL의 암모늄 용액(NH_4OH solution)을 첨가하여 반응시킴으로써 얻어지는 검은 색의 산화물일 수 있다.
- [0027] 전술한 금속계 자성 재료들은 예시적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 상기 나노 1차 입자들은, 상자성 금속 이온들, 예를 들면, Cu(II), Ni(II), Mn(II) 및/또는 VO(II)를 포함하는 측쇄 또는 폴리머를 함유하는 자성 고분자 재료일 수도 있다. 상기 나노 1차 입자들의 평균 직경은, 도 1e에 도시된 것과 같이 비제한적 예로서, 49.47 nm이다.
- [0028] 중합체 매트릭스(25)에 나노 1차 입자들(10)을 분산 고정된 2차 입자(100a)를 형성하기 위하여, 나노 1차 입자들(10)과 상기 중합체의 모노머 또는 저분자량 물질(20)을 용매 내에 첨가하여 섞고, 상기 모노머 또는 저분자량 물질(20)의 중합을 유도함으로써 2 차 입자(100a)를 얻을 수 있다. 일 실시예에서, 상기 중합체 매트릭스(25)는 폴리스타이렌을 포함할 수 있다. 예를 들면, 1 차 나노 입자들(10) (0.33 g)과 스타일렌(20)(6.6 mL)을 섞고, SDS 용액 (0.16%, 50 mL)을 가하고 70 도에서 가열하면서 potassium persulfate 용액 (0.2%, 5 mL)을 한 방울씩 가하여 상기 스타일렌을 중합하여 폴리스타이렌을 형성함으로써 황금색 2 차 입자(100a)를 형성할 수 있다.
- [0029] 일 실시예에서, 1 차 나노 입자들(10)과 스타일렌(20)과 함께 1-hexadecanol (0.2 g)이 더 첨가되어 섞일 수 있다. 1-hexadecanol (0.2 g)은 표면 보호제로서 첨가된다.
- [0030] 전술한 나노 1차 입자들(10)과 중합체 매트릭스(25)를 형성하기 위한 모노머 또는 저분자량 물질의 부피 및 중량은 후술하는 샘플 내에서 자성 비드(100)가 잘 분산될 수 있도록 적합한 비중을 가지면서, 외부 자기장에 따라 용이하게 유동할 수 있는 적합한 투자율을 갖도록 결정될 수 있다.
- [0031] 전술한 중합체 매트릭스(25)는 폴리스타이렌에 한정되는 것은 아니며, 중합체 매트릭스(25)는 이중 결합의 연쇄

반응을 이용하여 중합이 가능한 모노머로부터 형성되는 중합체를 포함할 수도 있다. 또한, 상기 표면 보호제로서 첨가된 1-hexadecanol을 대체하여, 또는 이와 함께 3 개 이상의 탄소 사슬과 알코올기, 카르복실기와 같은 기능기가 결합된 화합물이 첨가될 수도 있다.

- [0032] 2차 입자(100a)의 크기는, 도 1e에 도시된 것과 같이, 약 252.60 nm의 평균 직경을 가질 수 있다. 그러나, 이는 예시적일 뿐, 2차 입자(100a)의 크기는 100 nm 내지 500 nm의 범위 내일 수 있으며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 2차 입자(100a)의 표면 전하 제어를 위해 전하 조절제와 2 차 입자(100a)를 반응시켜 2 차 입자(100a) 상에 양전하를 갖는 표면층(30)을 형성하여 양 전하를 나타내는 중간 입자(100b)를 형성할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 전하 조절제, 즉, 표면층(20)은 폴리라이신을 포함할 수 있다. 그러나, 이는 예시적일 뿐, 3 개 이상의 탄소 사슬과 아미노기와 같은 양전하를 포함하는 화합물이 상기 전하 조절제로서 응용될 수 있다. 폴리라이신은 양전하를 갖기 때문에, 폴리스타일렌 매트릭스(25)와 이온성 결합 반응 또는 측쇄 반응을 통하여 양전하를 갖는 표면층(30)을 형성하면서 기공을 갖는 섬유형 표면 구조를 만들어 후술하는 나노 금속 입자들(NMP)의 결합을 용이하게 한다. 이를 제조하기 위해서, 예를 들면, 중합체 매트릭스(25)를 갖는 2차 입자(100a)에 폴리라이신 용액을 첨가하여 상온에서 24 시간 동안 반응시켜 폴라라이신의 표면층(30)이 형성된 중간 입자(100b)를 얻을 수 있다. 도 1e를 참조하면, 중간 입자(100b)의 평균 직경은 비제한적 예로서 약 272.31 nm로 2차 입자(100a)에 비하여 증가된 평균 직경을 갖는다.
- [0034] 자성 비드(100)는 표면층(30)이 형성된 중간 입자들(100b)을 나노 금속 입자들(NMP)이 분산된 분산 용액에 첨가하여 나노 금속 입자들(NMP)이 중간 입자(100b)의 표면층(30)에 결합됨으로써 얻어질 수 있다. 표면층(30)과 나노 금속 입자들(NMP)이 전기적 상호 작용을 통하여 서로 결합되고, 표면층(30)의 하전 극성이 양에서 음으로 역전될 수 있다.
- [0035] 나노 금속 입자들(NMP)은 금, 은, 티타늄, 텅스텐, 알루미늄 또는 이의 합금을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 금이다. 나노 금 입자들은 후술하는 것과 같이 황화수소기(-SH)와 특이적으로 결합할 수 있어, -SH를 포함하는 피분석 물질의 농축과 질량 분석을 위한 이온화를 고도의 효율로 수행한다.
- [0036] 자성 비드(100)의 표면 전하 상태는 음 전하를 갖는다. 양전하를 갖는 중간 입자(100b)의 표면층(30)은 나노 금속 입자들(NMP)과 서로 다른 전기적 극성에 의한 상호 인력으로 인해 결합되고, 전기적 극성이 역전되어 자성 비드(100)의 표면은 음 전하를 갖게 된다. 도 1d에는 제조된 나노 금 입자들(NMP)이 표면층(30)에 결합된 자성 비드(100)를 나타낸다. 자성 비드(100)의 평균 직경은, 도 1e에 도시된 것과 같이 비제한적 예로서, 약 287.69 nm이다.
- [0037] 도 1e에 도시된 나노 1차 입자, 폴리스타일렌을 포함하는 2 차 입자, 폴리라이신의 표면층을 갖는 중간 입자 및 나노 금 입자가 코팅된 자성 비드의 평균 직경은 동적 레이저 산란법을 이용하여 특정되었으며, 전술한 것과 같이 각각 49.47, 252.60, 272.31, 및 287.69 nm이었으며, 각 입자의 직경 분포는 ± 10 nm 이내의 고른 분포를 가진 것으로 측정되었다.
- [0038] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 각 제조 단계에서 형성되는 입자들의 표면 전하 값을 나타내는 그래프이다.
- [0039] 도 2를 참조하면, 나노 1차 입자(도 1a의 10 참조), 폴리스타일렌을 포함하는 2 차 입자(도 1a의 100a 참조), 폴리라이신의 표면층을 갖는 중간 입자(도 1a의 100b 참조), 및 나노 금 입자가 코팅된 자성 비드(도 1a의 100 참조)의 표면 전하는 제타 전위(Zeta potential, mV)의 측정을 통해 +40.06, -34.62, +35.08, 및 -30.02 mV 으 로 측정되었다. 전술한 것과 같이 최종 자성 비드의 표면은 음의 전하를 갖는다.
- [0040] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드(MB)를 이용한 피분석 물질의 농축과 말디토프 질량 분석을 위한 샘플 플레이트(SP)를 도시한다.
- [0041] 도 3을 참조하면, 컨테이너(200)에 샘플(300)이 수용되고, 샘플(300)은 질량 분석의 대상인 피분석 물질(AS)을 포함할 수 있다. 샘플(300) 내에는 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드(MB)가 제공되어 혼합되고, 양전하를 띠는 피분석 물질(AS)이 자성 비드(MB)의 음 전하를 띠는 표면과 전기적인 상호 작용을 통하여, 화살표 k로 나타난 것과 같이 자성 비드(MB) 상에 농축될 수 있다. 자성 비드(MB)가 나노 금 입자의 코팅 층을 갖는 경우에는 상기 나노 금 입자와 황화수소기(-SH)의 특이적 결합을 통해 자성 비드(MB)의 표면 상에 황화수소기를 포함하는 피분석 물질(AS)이 선택적으로 농축될 수도 있다. 참조 부호 CAS는 자성 비드(MB)의 표면 상에 농축된 피분석

물질을 지칭한다.

- [0042] 샘플(300) 내의 자성 비드(MB)는 샘플(300) 내에 균일하게 혼입되어 분산 상태를 유지하면서 피분석 물질(AS)을 농축할 수 있도록 교반 및 회전과 같은 유동을 겪을 수 있다. 필요에 따라, 자성 비드(MB)는 외부에서 인가되는 가변적 자기력에 의해 유동하면서 피분석 물질(AS)을 농축할 수도 있다. 상기 가변적 자기력은 컨테이너의 외부에 자기 코일이나 자기 막대를 부설하고, 상기 자기 코일이나 상기 자기 막대 자체를 구조적으로 변위시키거나 가변적 전기 에너지를 인가하여 자기장을 변조시켜 컨테이너(200) 내부의 자성 비드(MB)를 유동시켜 피분석 물질(AS)과의 농축을 더욱 촉진시킬 수 있다.
- [0043] 자성 비드(MB)에 의한 피분석 물질(AS)의 농축이 완료되면, 농축된 피분석 물질(CAS)을 갖는 자성 비드(MB)는 외부 자기장, 예를 들면, 화살표 m으로 나타낸 것과 같이 자석(EM)을 컨테이너(200)에 근접시켜 컨테이너(200) 내에서 소정 위치에 자성 비드(MB)를 모을 수 있다. 모아진 자성 비드(MB)를 수집하여 추가적인 세정 공정을 통해 샘플 플레이트(SP)를 준비할 수 있다. 일 실시예에서는, 농축된 피분석 물질(CAS)을 자석(EM) 없이 수거하고 세정 공정과 같은 후속 공정에서 자성 비드(MB)를 선별하기 위해 자석(EM)이 사용될 수도 있다.
- [0044] 피분석 물질(CAS)이 표면 상에 농축된 자성 비드(MB)는 수집되어 말디툼 질량 분석을 위한 샘플 플레이트(SP)로서 준비된다. 기관(SUB), 예를 들면, 스테인레스 기관 상에 수집된 자성 비드(MB)를 적지한다. 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드(MB)는 별도의 유기 매트릭스와 함께 혼합되지 않고서도 농축된 피분석 물질(CAS)의 질량 분석을 위한 매트릭스로 기능할 수 있으며, 이하에서는 이에 관하여 후술하도록 한다. 상기 피분석 물질(CAS)은 예시적으로 약 200 Da (Daltons) 내지 20,000 Da의 범위의 저분자량 영역에서 고분자량 영역까지 샘플 플레이트(SP)를 이용하여 신뢰성있는 질량 분석이 가능하다.
- [0045] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드와 비교예로서 α -시아노(ciano)-4-하이드록시시나믹산(hydroxycinnamic) (이하, CHCA라 함)을 각각 고체 매트릭스로 사용하여 아미노산을 말디툼 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 분석에는 극성 아미노산인 프롤린(Pro), 세린(Ser)과 산성 아미노산인 글루타릭 산(Glu), 염기성인 히스티딘(His)이 사용되었다. 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드는 도 1a를 참조하여 설명한 폴리스타일렌 매트릭스(25)에 폴리라이신의 표면층(30)과 나노 금 입자를 갖는 자성 비드(도 1a의 100 참조)이다.
- [0046] 도 4를 참조하면, 각각의 아미노산을 기준 말디툼 질량 분석에서 사용하는 유기 매트릭스인 CHCA로 분석할 경우 아미노산의 질량 피크 뿐만 아니라 유기 매트릭스에 의한 질량 피크가 동시에 관찰되었다. 그러나, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드(100)를 고체 매트릭스로서 사용하는 경우 각 아미노산의 질량 피크가 모두 관찰되었으며 고체 매트릭스로 사용된 자성 비드(100)에 의한 노이즈는 관찰되지 않았다. 따라서, 본 발명의 실시예에 따르는 경우, 말디툼 질량 분석을 위한 레이저 조사시 고체 매트릭스가 스스로 분해되지 않고, 피분석 물질의 이온화와 자성 비드의 표면으로부터 피분석 물질을 용이하게 탈착시키면서 자성 비드(100)로부터 유래된 질량 피크가 발생하지 않아, 저분자 영역의 피분석 물질에 대해서도 노이즈에 의한 간섭 문제 없이 신뢰성 있는 검출 및 동정이 가능하다.
- [0047] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로 사용하여 다양한 아미노산들을 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 정량 분석에는 비극성 아미노산인 프롤린, 극성 아미노산인 세린과 산성 아미노산인 글루타릭 산, 염기성인 히스티딘이 사용되었다.
- [0048] 도 5를 참조하면, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드를 종래의 유기 매트릭스를 대신하여 고체 매트릭스로서 사용하는 경우, 각각의 아미노산에 대해 측정한계는 약 5 ng/spot으로 측정되었다. 또한, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드를 사용한 경우, 10 - 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 범위에서 정량적인 질량 피크의 세기가 관찰되는 높은 선형성이 얻어질 수 있다.
- [0049] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로서 사용하여 아미노산의 혼합물을 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 상기 아미노산의 혼합물은 도 4 및 도 5를 참조하여 설명된 앞서 분석에는 사용된 비극성 아미노산인 프롤린, 극성 아미노산인 세린과 산성 아미노산인 글루타믹 산 및 염기성인 히스티딘을 혼합하여 제조되었다.
- [0050] 도 6을 참조하면, 각각의 아미노산에 의한 2개 또는 3 개의 금속 부가체(metal adduct)에 의한 질량 피크가 관찰되었다. 또한, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로 사용하는 경우, 기존 말디툼 질량 분석에서 발생하는 유기 매트릭스에 의한 질량 피크는 발견되지 않았다.
- [0051] 전술한 것과 같이, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드들을 고체 매트릭스로 사용하여 말디툼 질량 분석을 하는

경우, 저분자 영역에서 노이즈로 작용하는 질량 피크가 실질적으로 억제될 수 있다. 또한, 본 발명의 자성 비드를 사용하면 다양한 성질을 갖는 아미노산 분석에서 관찰된 바와 같이 무극성, 극성, 산성 및 염기성의 다양한 성질의 분자에 대한 질량 분석이 가능하다.

- [0052] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 이용한, 양전하를 가진 펩티드인 GHP9(G_1 -H-P-Q- G_2 - K_1 - K_2 - K_3 - K_4 , 1006.59 Da)의 농축 전후의 자성 비드의 표면 전하의 변화를 나타내는 그래프이다. 피분석 물질인 펩티드 GHP9는 9 개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며 양의 전하를 가지는 라이신을 말단에 4개를 포함하여 양전하를 가지는 펩티드이다.
- [0053] 도 7을 참조하면, 본 발명의 자성 비드는 펩티드와 혼합 전에는 음의 전하를 가지고 있으며, 혼합 후 피분석 물질이 흡착된 자성 비드는 펩티드 결합에 따라 양의 표면 전하를 가지는 것으로 관찰되었다. 상기 양의 표면 전하는, 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드가 갖는 음의 표면에 의해서 자성 비드가 양의 전하를 가진 펩티드를 자성 비드의 표면에 효과적으로 농축하였음을 나타낸다.
- [0054] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 고체 매트릭스로 이용하여 양전하를 가진 펩티드 GHP9를 농축 후 질량 분석한 결과와 종래의 유기 매트릭스(CHCA)를 이용하여 펩티드 GHP9를 질량 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0055] 도 8을 참조하면, 도 7을 참조하여 설명한 것과 같이 자성 비드(Au-MAG) 상에 펩티드 농축 후 수득된 자성 비드를 추가적인 유기 매트릭스없이 말디툼 질량 분석을 수행한 결과 펩티드 GHP9의 질량 피크가 나트륨 또는 칼륨과 결합된 금속 부가체(metal adduct) 형태로 관찰되었다. 이로써 본 발명의 자성 입자(Au-MAG)가 양의 전하를 가진 피분석 물질을 선택적으로 흡착한 후, 이를 고체 매트릭스로서 사용함으로써 추가적인 유기 매트릭스 없이도 신뢰성 있는 질량 분석이 가능함을 보여준다. 비교예로서, CHCA를 유기 매트릭스로서 이용하는 경우에는 피분석 대상물인 펩티드 GHP9의 이온화를 통한 질량 피크가 관찰되지 않았다.
- [0056] 도 7 및 도 8를 참조하여 상술한 피분석 물질의 농축은 본 발명의 실시예에 따른 자성 비드의 표면이 제공하는 음의 전하를 이용한 것이다. 자성 비드는 표면의 금속을 금으로 선택하는 경우, 금이 황화수소기와 강하게 결합하는 성질을 이용하여 황원자를 가지는 피분석 물질을 선택적으로 농축할 수도 있다. 이와 같이, 자성 비드의 표면에 결합되는 나노 금속 입자의 종류에 따라 농축되는 피분석 물질의 종류를 결정할 수 있다.
- [0057] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 나노 금 입자가 코팅된 자성 비드(Au-MAG)를 이용하여 티오글리콜산나트륨(Sodium thioglycolate)를 농축 후 질량 분석한 결과와 비교예에 따른 유기 매트릭스(CHCA)를 이용한 티오글리콜산나트륨을 질량 분석한 결과를 비교하여 나타내는 그래프이다. 티오글리콜산나트륨은 중성 아미노산으로서 글리신과 매우 유사한 구조를 가지며, 분자내 황화수소기(-SH)를 갖는다.
- [0058] 도 9를 참조하면, 샘플 내에 피분석 물질인 티오글리콜산나트륨을 낮은 농도로 혼합하였다. 해당 농도에서는 그래프에서 보이는 바와 같이 기존 유기 매트릭스인 CHCA로 분석이 불가능하였다. 본 발명의 실시예에 따른 금 콜로이드가 코팅되어 나노 금 입자를 갖는 자성 비드(Au-MAG; MB)를 샘플(300)에 첨가하여 황화수소기를 갖는 피분석 물질(AS)인 티오글리콜산나트륨이 자성 입자(Au-MAG)의 나노 금 나노에 선택적으로 흡착됨으로써, 자성 입자(Au-MAG)의 표면에 티오글리콜산나트륨의 농축될 수 있다. 티오글리콜산나트륨의 농축 과정 후 외부 자석(EM)을 이용하여 자성 비드(Au-MAG)를 분리해 내어 유기 매트릭스 없이 질량 분석한 결과 티오글리콜산나트륨의 질량 피크가 관찰되었다.
- [0059] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 자성 비드를 이용하여 메치오닌(Methionone)을 농축 후 상기 자성 비드를 고체 매트릭스로서 이용하여 메치오닌을 분석한 결과와 비교예에 따른 유기 매트릭스(CHCA)를 이용하여 메치오닌을 질량 분석한 결과를 비교하여 나타내는 그래프이다.
- [0060] 도 10을 참조하면, 메치오닌은 전술한 글리신과 구조가 매우 유사하며, 분자 내에 황화수소기를 가지고 있다. 상기 메치오닌을 피분석 물질로서 샘플에 낮은 농도로 혼합하였다. 금 콜로이드가 코팅되어 나노 금 입자를 갖는 자성 비드(Au-MAG)를 샘플에 가하여 분석대상물인 메치오닌을 자성 비드(Au-MAG)의 나노 금 입자에 선택적으로 흡착시켜 자성 입자의 표면에 메치오닌이 농축될 수 있다. 농축 후 외부 자석(EM)을 이용하여 자성 비드(Au-MAG)를 샘플로부터 분리하고, 추가 유기 매트릭스 없이 질량 분석한 결과 메치오닌의 질량 피크가 관찰되었다.
- [0061] 전술한 피분석 물질들은 예시적이며, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 피분석 물질은 200 Da 내지 20,000 Da의 범위 내의 분자량을 갖는 여하의 물질일 수 있다. 이와 같은 결과로부터, 나노 금 입자를 갖는 자

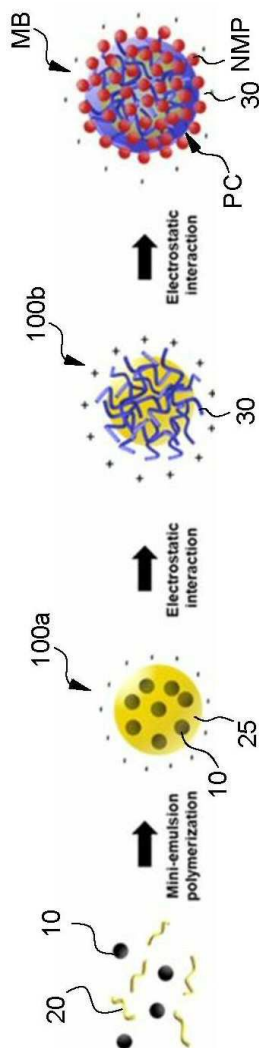
성 비드(Au-MAG)를 사용하여 샘플 내에 극미량 존재하는 황원자를 포함하고 있는 피분석 물질을 자성 비드(Au-MAG)의 표면에 질량 분석이 가능한 수준으로 선택적으로 농축할 수 있으며, 농축된 상태의 자성 비드를 추가적인 유기 매트릭스 없이 그대로 고체 매트릭스로서 사용하여 피분석 물질의 질량 분석이 가능함을 알 수 있다.

[0063]

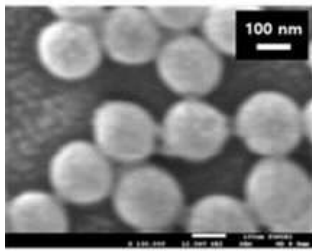
이상에서 설명한 본 발명이 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 오직 하기의 특허청구범위에 의해서만 한정된다.

도면

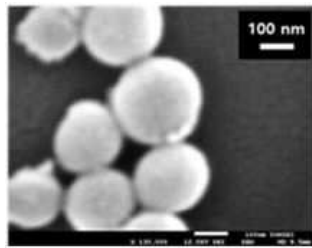
도면1a



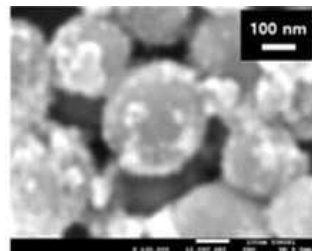
도면1b



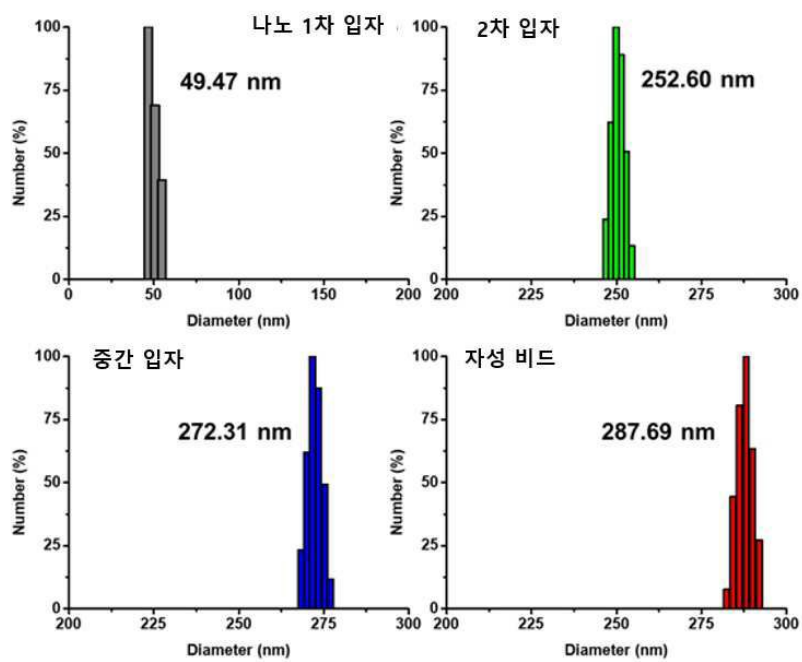
도면1c



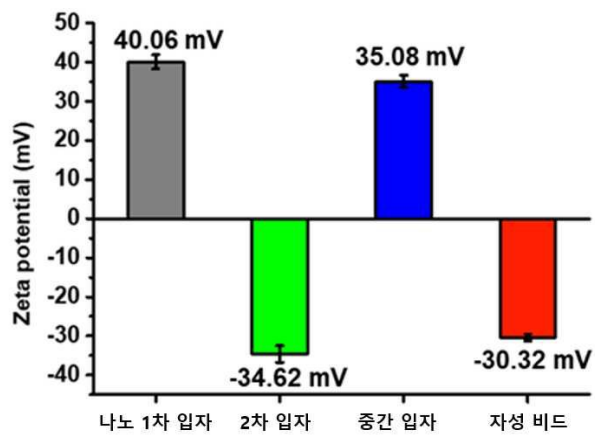
도면1d



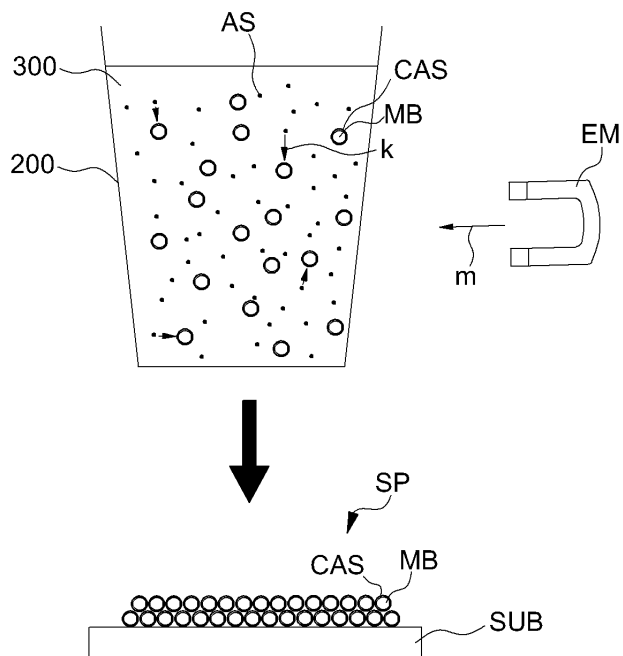
도면1e



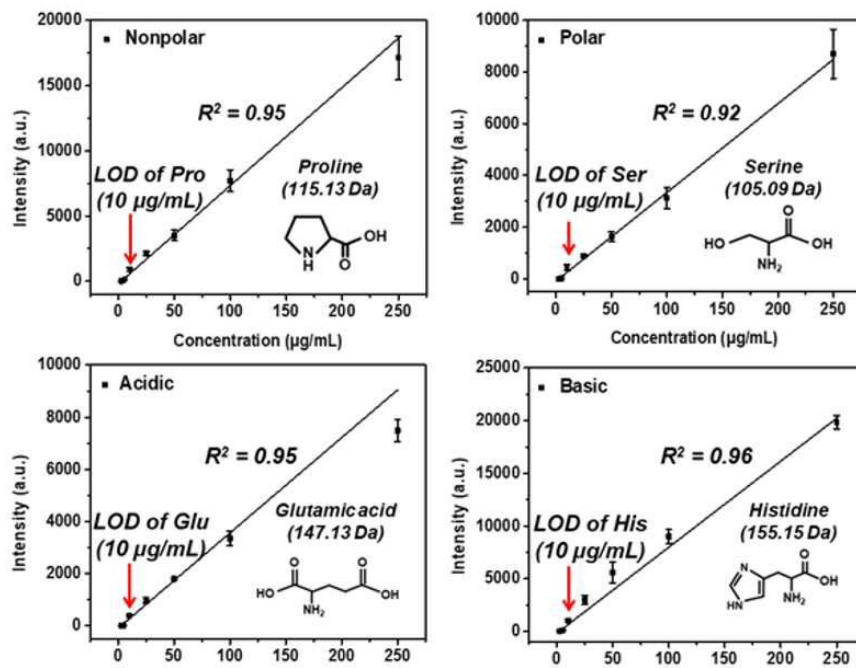
도면2



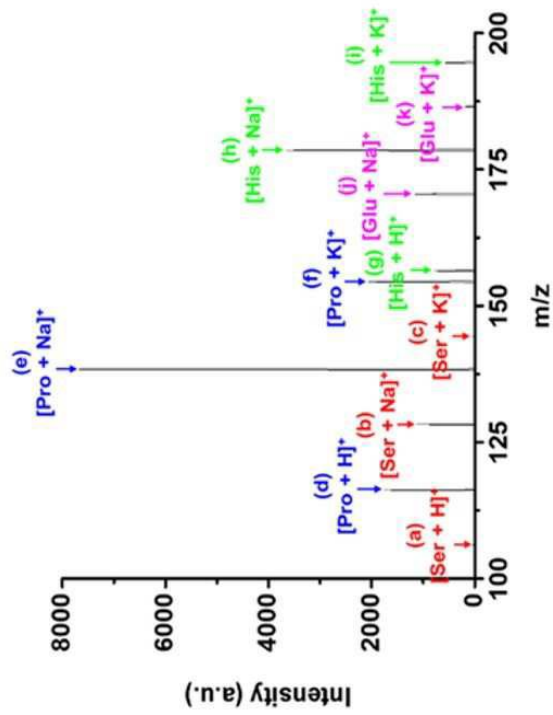
도면3



도면5

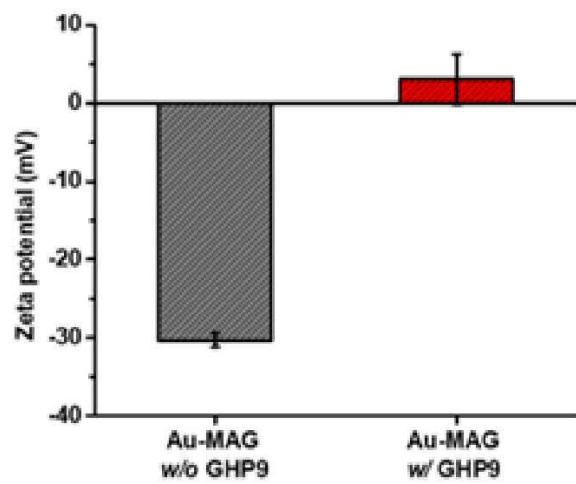


도면6

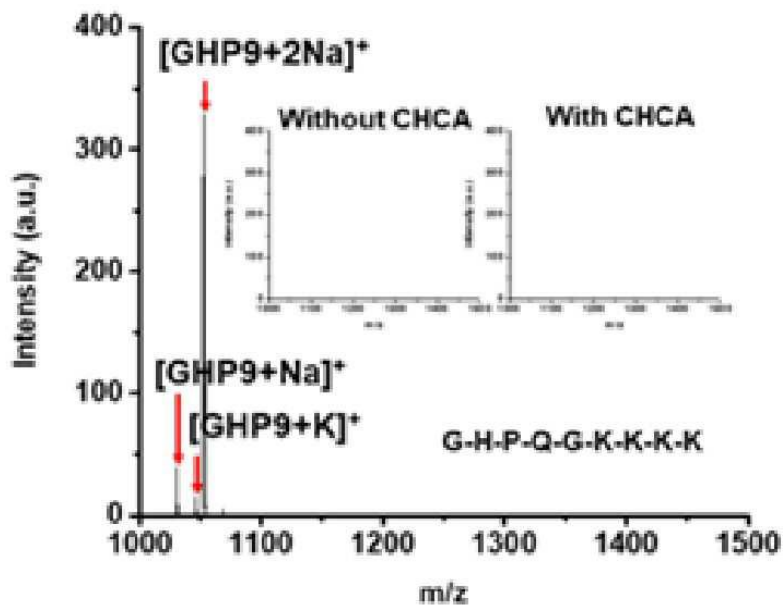


Label	Peaks
(a)	[Ser + H] ⁺ = 106.2
(b)	[Ser + Na] ⁺ = 128.3
(c)	[Ser + K] ⁺ = 144.3
(d)	[Pro + H] ⁺ = 116.3
(e)	[Pro + Na] ⁺ = 138.3
(f)	[Pro + K] ⁺ = 154.4
(g)	[His + H] ⁺ = 156.4
(h)	[His + Na] ⁺ = 178.5
(i)	[His + K] ⁺ = 194.5
(j)	[Glu + Na] ⁺ = 170.4
(k)	[Glu + K] ⁺ = 186.5

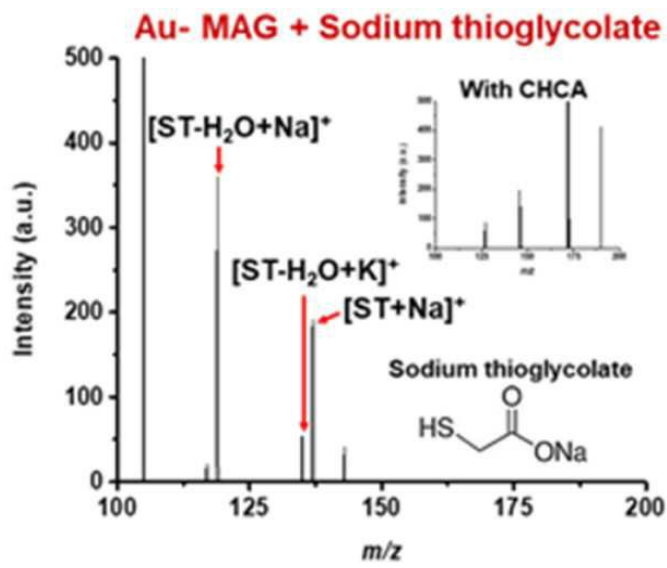
도면7



도면8



도면9



도면10

