(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0085803
(43) 공개일자 2017년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/02 (2006.01) *G01N 30/34* (2006.01)
G01N 30/82 (2006.01) *G01N 30/89* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/02 (2013.01)
G01N 30/34 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0005394
(22) 출원일자 2016년01월15일
심사청구일자 2016년01월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이상원
서울특별시 성북구 인촌로17가길 64, 108동 602호 (안암동1가, 래미안안암아파트)
이한겨레
서울특별시 성북구 인촌로7나길 41 (안암동1가)
(74) 대리인
특허법인충현

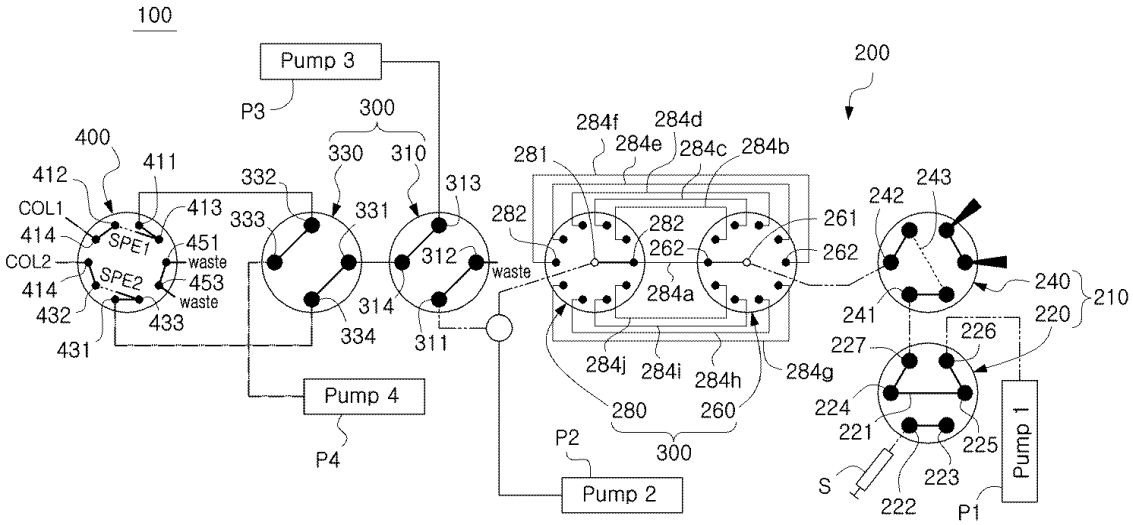
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 이를 구비한 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치**

(57) 요 약

비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 이를 구비한 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치가 개시된다. 본 발명의 일 실시예에 따른 비연속적 시료 분획 및 통합유닛은, 분석 대상이 되는 시료를 공급하는 시료 공급모듈; 및 시료 공급모듈에 연결되어 시료를 연속적으로 공급받으며, 시료 공급모듈로부터 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정하고 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한 후 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 시료를 통합 저장하여 복수의 분획시료를 획득하는 시료 분획모듈을 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 30/82 (2013.01)
G01N 30/89 (2013.01)
G01N 2030/027 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015028885
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 다중오믹스신기술개발사업
연구과제명 난치암 동반진단법 및 표적 치료제 개발을 위한 유전단백체 분석
기 여 율 1/2
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015045084
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 뇌영상 근거 알츠하이머성 치매환자에 대한 바이오 마커 발굴 및 조기진단 플랫폼을 통한 예측기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2015.07.01 ~ 2016.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

분석 대상이 되는 시료를 공급하는 시료 공급모듈; 및

상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료를 연속적으로 공급받으며, 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정하고 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한 후 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 통합 저장하여 복수의 분획시료를 획득하는 시료 분획모듈을 포함하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료 분획모듈은,

상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료가 유입되는 제1 분획밸브;

상기 제1 분획밸브에 인접하게 마련되는 제2 분획밸브; 및

일단이 상기 제1 분획밸브에 연결되고 타단이 상기 제2 분획밸브에 연결되되, 상기 단위 시료공급시간 내의 복수의 단위 분획구간의 개수에 대응되어 복수 개 마련되며, 각각의 상기 단위 시료공급시간 내의 대응되는 상기 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 순차로 통합 저장하는 분획시료 저장루프를 포함하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1 분획밸브는,

상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료가 유입되는 분획시료 유입포트;

상기 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프의 일단에 각각 연결되는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트; 및

상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 유입포트와 상기 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제1 연결바를 포함하며,

상기 제2 분획밸브는,

상기 복수의 분획시료 저장루프의 타단이 각각 연결되는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트;

상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프 중 어느 하나의 타단에 연결되어 상기 분획시료가 배출되는 분획시료 배출포트; 및

상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 배출포트와 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제2 연결바를 포함하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 시료 공급모듈은,

제1 용매를 공급하는 제1 펌프와 시료 주입기가 연결되는 제1 시료 공급밸브; 및

상기 제1 시료 공급밸브에 연결되며 상기 제1 시료 공급밸브로부터 상기 시료를 공급받아 상기 분획시료 유입포

트로 공급하는 제2 시료 공급밸브를 포함하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 제1 시료 공급밸브는,

상기 시료 주입기에 연결되는 제1 시료 유입포트;

상기 제1 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 시료 배출포트;

상기 제1 펌프에 연결되는 제1 용매 유입포트;

상기 제1 용매 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 제2 시료 공급밸브에 연결되는 제1 용매 배출포트; 및

시료 저장루프의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트와 제2 시료 저장루프 연결포트를 포함하며,

상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 시료 유입포트와 상기 제1 시료 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료가 상기 시료 저장루프에 저장되고,

상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 용매 유입포트와 상기 제1 용매 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 상기 제1 용매를 주입하여 상기 시료를 상기 제2 시료 공급밸브에 공급하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 제2 시료 공급밸브는,

상기 제1 용매 배출포트에 연결되는 제2 시료 유입포트;

상기 제2 시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 분획시료 유입포트에 연결되는 제2 시료 배출포트; 및

상기 제2 시료 유입포트와 상기 제2 시료 배출포트에 양단이 각각 연결되며, 상기 제2 시료 배출포트로 상기 시료가 용출되는 시료 분리칼럼을 포함하며,

상기 시료 분리칼럼에서 용출된 상기 시료는 상기 분획시료 유입포트로 공급되는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛.

청구항 7

분석 대상이 되는 시료를 연속적으로 공급받으며, 상기 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정하고 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한 후 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 통합 저장하여 획득한 복수의 분획시료를 공급하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛;

제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼이 연결되며, 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 연결되는 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 연결되는 제2 고체상 추출칼럼을 구비한 이중 칼럼밸브; 및

상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 상기 이중 칼럼밸브 사이에 마련되되, 상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛에서 순차로 공급되는 상기 분획시료를 교대로 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하는 칼럼 선택모듈을 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛은,

상기 시료를 공급하는 시료 공급모듈; 및

상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료를 연속적으로 공급받아 복수의 분획시료를 획득하고 상기 칼럼 선택모듈에 상기 복수의 분획시료를 순차로 공급하는 시료 분획모듈을 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 시료 분획모듈은,

상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료가 유입되는 제1 분획밸브;

상기 제1 분획밸브에 인접하게 마련되는 제2 분획밸브; 및

일단이 상기 제1 분획밸브에 연결되고 타단이 상기 제2 분획밸브에 연결되되, 상기 단위 시료공급시간 내의 복수의 단위 분획구간의 개수에 대응되어 복수 개 마련되며, 각각의 상기 단위 시료공급시간 내의 대응되는 상기 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 순차로 통합 저장하는 복수의 분획시료 저장루프를 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제1 분획밸브는,

상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료가 유입되는 제1 분획시료 유입포트;

상기 제1 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프의 일단이 각각 연결되는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트; 및

상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 유입포트와 상기 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제1 연결바를 포함하며,

상기 제2 분획밸브는,

상기 복수의 분획시료 저장루프의 타단이 각각 연결되는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트;

상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프 중 어느 하나의 타단이 연결되어 상기 분획시료가 배출되는 제1 분획시료 배출포트; 및

상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 제1 분획시료 배출포트와 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제2 연결바를 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 시료 공급모듈은,

시료 주입기로에 연결되는 제1 시료 유입포트와, 상기 제1 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 시료 배출포트와, 제1 펌프에 연결되는 제1 용매 유입포트와, 상기 제1 용매 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 용매 배출포트와, 시료 저장루프의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트와 제2 시료 저장루프 연결포트를 구비한 제1 시료 공급밸브; 및

상기 제1 용매 배출포트에 연결되는 제2 시료 유입포트와, 상기 제2 시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 제1 분획시료 유입포트에 연결되는 제2 시료 배출포트와, 상기 제2 시료 유입포트와 상기 제2 시료 배출포트에 양단이 각각 연결되어 상기 제2 시료 배출포트로 상기 시료가 용출되는 시료 분리칼럼을 구비한 제2 시료 공급밸브를 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 칼럼 선택모듈은,

상기 제1 분획시료 배출포트에 연결되며, 상기 복수의 분획시료를 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼에 교대로 공급하는 경로를 제공하고 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 교대로 평형화하는 칼럼 평형화밸브; 및

상기 칼럼 평형화밸브에 연결되어 상기 복수의 분획시료를 공급받아 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼에 교대로 공급하며, 상기 제1 고체상 추출칼럼에서 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 상기 분획시료가 용출되거나 상기 제2 고체상 추출칼럼에서 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 상기 분획시료가 용출되게 하는 칼럼 선택밸브를 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 칼럼 평형화밸브는,

상기 제1 분획시료 배출포트와 제2 용매를 공급하는 제2 펌프에 연결되는 제2 분획시료 유입포트;

제3 용매를 공급하는 제3 펌프에 연결되어 상기 제3 용매가 유입되는 제3 용매 유입포트;

상기 제2 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제2 분획시료 배출포트; 및

상기 제3 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제3 용매 배출포트를 포함하며,

상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제2 용매가 주입된 상기 분획시료가 상기 칼럼 선택밸브를 거쳐 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼으로 공급되고,

상기 제3 용매 유입포트와 상기 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기 칼럼 선택밸브를 거쳐 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 교대로 평형화하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 칼럼 선택밸브는,

상기 제3 용매 배출포트에 연결되어 상기 분획시료 또는 상기 제3 용매가 유입되는 분획시료 및 제3 용매 유입포트;

제4 용매를 공급하는 제4 펌프에 연결되어 상기 제4 용매가 유입되는 제4 용매 유입포트;

상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 분획시료 및 제3 용매 배출포트; 및

상기 제4 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제4 용매 배출포트를 포함하며,

상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트가 연결되어 상기 분획시료가 상기 제1 고체상 추출칼럼으로 공급된 후 상기 제4 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제4 용매가 상기 분획시료를 상기 제1 고체상 추출칼럼에서 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 용출하고 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하며,

상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결되어 상기 분획시료가 상기 제2 고체상 추출칼럼으로 공급된 후 상기 제4 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제4 용매가 상기 분획시료를 상기 제2 고체상 추출칼럼에서 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 용출하고 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출토트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기

제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그레피 칼럼을 평형화하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 이중 칼럼밸브는,

상기 제1 고체상 추출칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트;

상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트와 연결되되, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 유입포트;

상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트;

상기 제2 고체상 추출칼럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트;

상기 제4 용매 배출포트와 연결되되, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출칼럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 유입포트; 및

상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트를 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 이중 칼럼밸브는,

상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 배출포트; 및

상기 제1 배출포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출칼럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 더 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 이를 구비한 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는, 시료의 복잡성을 낮추고 분획시료의 균일성을 높이는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 이를 구비한 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체 내에서 특정 조건 하에 발현된 모든 단백질을 총체적으로 연구하는 학문인 단백체학(프로테오믹스)에서 액체크로마토그래피 장치와 질량 분석 기술을 연계한 방법(LC-MS/MS)이 매우 중요한 기술로 대두되고 있다.

[0003] 이 중에서도 단백질을 작은 단위체인 펩티드로 가수분해하여 분석하는 바텀업 프로테오믹스(bottom-up or shotgun proteomics)방식이 널리 사용되고 있다.

[0004] 바텀업 프로테오믹스 방법은 그 유용함이 증명되었지만 불가피하게 시료의 복잡성을 야기한다. 예를 들어 대략 이만 개의 유전체로부터 발현된 단백질을 펩티드로 가수분해하였을 때 수천만 종 이상의 펩티드가 얻어진다. 또한 생체 내 단백질은 넓은 범위의 농도 다이내믹레인지를(10^{10}) 갖는다. 따라서 이러한 시료의 복잡성을 해결하고 효과적인 단백체 분석을 하기 위해서는 고분해능을 갖는 분리방법을 필요로 한다.

[0005] 이러한 문제점을 해결하기 위한 기술로 이차원 액체크로마토그래피 기술이 있다. 이는 서로 다른 두 가지의 분

리방법을 통합하여 사용하는 것이다.

[0006] 이차원 액체크로마토그래피의 성공 여부를 결정할 수 있는 두 가지 요소가 있는데 첫 번째는 각 분리방법의 분리효율이고, 두 번째는 분리직교성 (orthogonality)이다.

[0007] 분리직교성이란 각 분리방법에 의해서 시료 혼합물이 서로 다른 방식으로 즉 서로 다른 물리화학적 특성에 의해서 분리가 되어야 한다는 것이다.

[0008] 최근에 많이 개발되고 사용되는 이차원 분리방법 중에 하나는 시료를 염기성의 pH하에서 소수성의 정도에 따라 분획한 뒤 분리된 분획시료들을 다시 산성의 pH 조건 하에서 소수성의 정도에 따라 분리하는 것이다(이차원 역상액체크로마토그래피-역상액체크로마토그래피, 2D RP-RPLC).

[0009] 기본적으로 소수성에 의해서 두 번 분리를 하는 것은 분리직교성을 갖는다고 할 수 없지만, 서로 다른 pH조건에서 펩티드들은 고유의 아미노산 서열에 따라 서로 다른 전하 분포를 갖게 되고 따라서 동일한 펩티드일 지라도 서로 다른 정도의 소수성을 갖게 된다. 이로 인해 2D RP-RPLC 방법이 분리직교성을 갖게 된다.

[0010] 하지만 2D RP-RPLC 방법이 완전한 분리직교성을 갖지는 못한다. 도 1은 pH 10에서 RPLC 분리를 한 뒤 각 분획시료를 다시 pH2.6에서 RPLC 분리를 하여 질량분석장치로 분석한 뒤 동정된 펩티드의 분포를 각 분리방법의 용출 시간에서의 분포를 나타낸 것이다. 도 1에서 보면 펩티드들이 나타나지 않은 부분들이 많이 보이는데 이것은 2D RP-RPLC 방법이 이차원 분리의 분리공간을 모두 사용하지 못했다는 것을 의미한다.

[0011] 이러한 문제점을 해결하기 위해 개발된 방법이 분획 후 비연속적 통합 기술이다. 도 2a를 참조하면, 분획 후 비연속적 통합기술은 염기성 pH하에서 RPLC 분리를 할 때 용출된 순서에 따라 96개(1번~ 96번)로 나눈 뒤 다시 24개의 분획시료로 통합을 하는데 이때 연속적으로 통합하는 것이 아니라 1번부터 24번까지를 24개의 분획시료로 만든 뒤 다시 25번을 1번째 분획시료에 통합하고 26번을 2번째 분획시료에 통합한다. 이렇게 했을 때 1번째 분획시료에는 1,25,49,73번이 2번째 분획시료에는 2,26,50,74번이 마지막 24번째 분획시료에는 24,48,72,96번이 통합되게 된다. 이런 방식으로 비연속적인 통합을 하였을 때 도 2b에서 도시한 바와 같이 이차원 분리의 전체 분리공간을 사용할 수 있게 된다.

[0012] 이러한 분획 후 비연속적 통합 기술을 통해 2D RP-RPLC 기술의 분리공간을 모두 활용하여 분리직교성을 확보하게 된다.

[0013] 그러나, 이러한 통합 과정을 연구자가 직접 수행해야 하기 때문에 인력과 시간이 많이 필요하게 된다. 또한 오프라인 방식으로 얻어진 분획시료를 산성 pH하에서 LC-MS/MS 실험을 하기 위해서는 분획시료의 부피를 줄이고 LC-MS/MS 실험이 가능한 용매에 다시 녹여주는 등 여러 처리 단계를 필요로 하고 이 과정에서 시료의 손실이 발생할 수 있으며 실험의 재현성에도 영향을 줄 수 있다. 따라서, 이러한 과정이 시료주입 이후에 모두 자동으로 일어날 수 있는 액체크로마토그래피 장치에 대한 개발이 요구된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0014] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: M Gilar et al, Anal Chem, 2005, 77, 6426-6434

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: J.M. Park et al, Sci.Rep.5, 18189; doi:10.1038/srep18189 (2015)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 시료의 복잡성을 낮추고 분획시료의 균일성을 높이는 비연속적 시료분획 및 통합과정을 자동화하여, 분획 재현성을 향상시키며 시료의 손실을 방지할 수 있는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 이를 구비한 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 측면에 따르면, 분석 대상이 되는 시료를 공급하는 시료 공급모듈; 및 상기 시료 공급모듈에 연결

되어 상기 시료를 연속적으로 공급받으며, 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정하고 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한 후 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 통합 저장하여 복수의 분획시료를 획득하는 시료 분획모듈을 포함하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛이 제공될 수 있다.

[0017] 상기 시료 분획모듈은, 상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료가 유입되는 제1 분획밸브; 상기 제1 분획밸브에 인접하게 마련되는 제2 분획밸브; 및 일단이 상기 제1 분획밸브에 연결되고 타단이 상기 제2 분획밸브에 연결되되, 상기 단위 시료공급시간 내의 복수의 단위 분획구간의 개수에 대응되어 복수 개 마련되며, 각각의 상기 단위 시료공급시간 내의 대응되는 상기 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 순차로 통합 저장하는 분획시료 저장루프를 포함할 수 있다.

[0018] 상기 제1 분획밸브는, 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료가 유입되는 분획시료 유입포트; 상기 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프의 일단에 각각 연결되는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트; 및 상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 유입포트와 상기 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제1 연결바를 포함하며, 상기 제2 분획밸브는, 상기 복수의 분획시료 저장루프의 타단이 각각 연결되는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트; 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프 중 어느 하나의 타단에 연결되어 상기 분획시료가 배출되는 분획시료 배출포트; 및 상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 배출포트와 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제2 연결바를 포함할 수 있다.

[0019] 상기 시료 공급모듈은, 제1 용매를 공급하는 제1 펌프와 시료 주입기가 연결되는 제1 시료 공급밸브; 및 상기 제1 시료 공급밸브에 연결되며 상기 제1 시료 공급밸브로부터 상기 시료를 공급받아 상기 분획시료 유입포트로 공급하는 제2 시료 공급밸브를 포함할 수 있다.

[0020] 상기 제1 시료 공급밸브는, 상기 시료 주입기에 연결되는 제1 시료 유입포트; 상기 제1 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 시료 배출포트; 상기 제1 펌프에 연결되는 제1 용매 유입포트; 상기 제1 용매 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 제2 시료 공급밸브에 연결되는 제1 용매 배출포트; 및 시료 저장루프의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트와 제2 시료 저장루프 연결포트를 포함하며, 상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 시료 유입포트와 상기 제1 시료 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료가 상기 시료 저장루프에 저장되고, 상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 용매 유입포트와 상기 제1 용매 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 상기 제1 용매를 주입하여 상기 시료를 상기 제2 시료 공급밸브에 공급할 수 있다.

[0021] 상기 제2 시료 공급밸브는, 상기 제1 용매 배출포트에 연결되는 제2 시료 유입포트; 상기 제2 시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 분획시료 유입포트에 연결되는 제2 시료 배출포트; 및 상기 제2 시료 유입포트와 상기 제2 시료 배출포트에 양단이 각각 연결되며, 상기 제2 시료 배출포트로 상기 시료가 용출되는 시료 분리칼럼을 포함하며, 상기 시료 분리칼럼에서 용출된 상기 시료는 상기 분획시료 유입포트로 공급될 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 분석 대상이 되는 시료를 연속적으로 공급받으며, 상기 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정하고 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한 후 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 통합 저장하여 획득한 복수의 분획시료를 공급하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛; 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼이 연결되며, 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 연결되는 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼과 연결되는 제2 고체상 추출칼럼을 구비한 이중 칼럼밸브; 및 상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛과 상기 이중 칼럼밸브 사이에 마련되되, 상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛에서 순차로 공급되는 상기 분획시료를 교대로 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하는 칼럼 선택모듈을 포함하는 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치가 제공될 수 있다.

[0023] 상기 비연속적 시료 분획 및 통합유닛은, 상기 시료를 공급하는 시료 공급모듈; 및 상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료를 연속적으로 공급받아 복수의 분획시료를 획득하고 상기 칼럼 선택모듈에 상기 복수의 분획시료를 순차로 공급하는 시료 분획모듈을 포함할 수 있다.

[0024] 상기 시료 분획모듈은, 상기 시료 공급모듈에 연결되어 상기 시료가 유입되는 제1 분획밸브; 상기 제1 분획밸브

에 인접하게 마련되는 제2 분획밸브; 및 일단이 상기 제1 분획밸브에 연결되고 타단이 상기 제2 분획밸브에 연결되되, 상기 단위 시료공급시간 내의 복수의 단위 분획구간의 개수에 대응되어 복수 개 마련되며, 각각의 상기 단위 시료공급시간 내의 대응되는 상기 단위 분획구간 동안 공급받은 상기 시료를 순차로 통합 저장하는 복수의 분획시료 저장루프를 포함할 수 있다.

[0025] 상기 제1 분획밸브는, 상기 시료 공급모듈로부터 상기 시료가 유입되는 제1 분획시료 유입포트; 상기 제1 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프의 일단이 각각 연결되는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트; 및 상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 분획시료 유입포트와 상기 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제1 연결바를 포함하며, 상기 제2 분획밸브는, 상기 복수의 분획시료 저장루프의 타단이 각각 연결되는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트; 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 복수의 분획시료 저장루프 중 어느 하나의 타단이 연결되어 상기 분획시료가 배출되는 제1 분획시료 배출포트; 및 상기 단위 분획구간에 대응하여 상기 제1 분획시료 배출포트와 상기 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제2 연결바를 포함할 수 있다.

[0026] 상기 시료 공급모듈은, 시료 주입기로에 연결되는 제1 시료 유입포트와, 상기 제1 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 시료 배출포트와, 제1 펌프에 연결되는 제1 용매 유입포트와, 상기 제1 용매 유입포트에 인접하게 마련되는 제1 용매 배출포트와, 시료 저장루프의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트와 제2 시료 저장루프 연결포트를 구비한 제1 시료 공급밸브; 및 상기 제1 용매 배출포트에 연결되는 제2 시료 유입포트와, 상기 제2 시료 유입포트에 인접하게 마련되며 상기 제1 분획시료 유입포트에 연결되는 제2 시료 배출포트와, 상기 제2 시료 유입포트와 상기 제2 시료 배출포트에 양단이 각각 연결되어 상기 제2 시료 배출포트로 상기 시료가 용출되는 시료 분리칼럼을 구비한 제2 시료 공급밸브를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 칼럼 선택모듈은, 상기 제1 분획시료 배출포트에 연결되며, 상기 복수의 분획시료를 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼에 교대로 공급하는 경로를 제공하고 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 교대로 평형화하는 칼럼 평형화밸브; 및 상기 칼럼 평형화밸브에 연결되어 상기 복수의 분획시료를 공급받아 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼에 교대로 공급하며, 상기 제1 고체상 추출칼럼에서 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 상기 분획시료가 용출되거나 상기 제2 고체상 추출칼럼에서 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 상기 분획시료가 용출되게 하는 칼럼 선택밸브를 포함할 수 있다.

[0028] 상기 칼럼 평형화밸브는, 상기 제1 분획시료 배출포트와 제2 용매를 공급하는 제2 펌프에 연결되는 제2 분획시료 유입포트; 제3 용매를 공급하는 제3 펌프에 연결되어 상기 제3 용매가 유입되는 제3 용매 유입포트; 상기 제2 분획시료 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제2 분획시료 배출포트; 및 상기 제3 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제3 용매 배출포트를 포함하며, 상기 제2 분획시료 유입포트와 상기 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제2 용매가 주입된 상기 분획시료가 상기 칼럼 선택밸브를 거쳐 상기 제1 고체상 추출칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼으로 공급되고, 상기 제3 용매 유입포트와 상기 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기 칼럼 선택밸브를 거쳐 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼 또는 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 교대로 평형화할 수 있다.

[0029] 상기 칼럼 선택밸브는, 상기 제3 용매 배출포트에 연결되어 상기 분획시료 또는 상기 제3 용매가 유입되는 분획시료 및 제3 용매 유입포트; 제4 용매를 공급하는 제4 펌프에 연결되어 상기 제4 용매가 유입되는 제4 용매 유입포트; 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 분획시료 및 제3 용매 배출포트; 및 상기 제4 용매 유입포트에 인접하게 마련되어 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 유입포트에 선택적으로 연결되는 제4 용매 배출포트를 포함하며, 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트가 연결되어 상기 분획시료가 상기 제1 고체상 추출칼럼으로 공급된 후 상기 제4 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제4 용매가 상기 분획시료를 상기 제1 고체상 추출칼럼에서 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 용출하고 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기 제2 고체상 추출칼럼과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하며, 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결되어 상기 분획시료가 상기 제2 고체상 추출칼럼으로 공급된 후 상기 제4 용매 유입포트와 상기 제4 용매 배출포트가 연결된 상태에서 상기 제4 용

매가 상기 분획시료를 상기 제2 고체상 추출칼럼에서 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼으로 용출하고 상기 분획시료 및 제3 용매 유입포트와 상기 분획시료 및 제3 용매 배출토트가 연결된 상태에서 상기 제3 용매가 상기 제1 고체상 추출칼럼과 상기 제1 역상 액체크로마토그레피 칼럼을 평형화할 수 있다.

[0030] 상기 이중 칼럼밸브는, 상기 제1 고체상 추출칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트; 상기 분획시료 및 제3 용매 배출포트와 연결되되, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 유입포트; 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트; 상기 제2 고체상 추출칼럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트; 상기 제4 용매 배출포트와 연결되되, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출칼럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 유입포트; 및 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트를 포함할 수 있다.

[0031] 상기 이중 칼럼밸브는, 상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출칼럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 배출포트; 및 상기 제1 배출포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출칼럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 실시예는 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 시료를 통합 저장하여 복수의 분획시료를 자동으로 얻을 수 있는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛을 구비함으로써, 시료의 복잡성을 낮추고 분획시료의 균일성을 높이며, 분획 재현성을 향상시킬 수 있으며 아울러 시료의 손실을 방지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 pH 10에서 RPLC 분리를 한 뒤 각 분획시료를 다시 pH2.6에서 RPLC 분리를 하여 질량분석장치로 분석한 뒤 동정된 펩티드의 분포를 나타내는 도면이다.

도 2는 시료를 분획 후 비연속적으로 통합하는 기술을 설명하기 위한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제10 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료를 제1 고체상 추출칼럼에 공급하는 동작을 나타내는 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료를 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하고 제2 고체상 추출칼럼과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하는 동작을 나타내는 도면이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료를 제2 고체상 추출칼럼에 공급하는 동작을 나타내는 도면이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료를 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하고 제1 고체상 추출칼럼과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하는 동작을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 본 발명과 본 발명의 동작상의 이점 및 본 발명의 실시에 의하여 달성되는 목적을 충분히 이해하기 위해서는 본 발명의 바람직한 실시 예를 예시하는 첨부 도면 및 첨부 도면에 기재된 내용을 참조하여야만 한다.

[0035] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 설명함으로써, 본 발명을 상세히 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0036] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이고, 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이고, 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제10 분획시료의 획득 동작을 나타내는 도면이고, 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료를 제1 고체상 추출칼럼에 공급하는 동작을 나타내는 도면이고, 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제1 분획시료를 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하고 제2 고체상 추출칼럼과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하는 동작을 나타내는 도면이고, 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료를 제2 고체상 추출칼럼에 공급하는 동작을 나타내는 도면이고, 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치로서, 제2 분획시료를 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에 공급하고 제1 고체상 추출칼럼과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 평형화하는 동작을 나타내는 도면이다.

[0037] 도 3 내지 도 5를 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치(100)는 분석 대상이 되는 시료를 연속적으로 공급받아 복수의 분획시료를 획득하여 공급하는 비연속적 시료 분획 및 통합유닛(200)과, 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)이 연결되며 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)과 연결되는 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)과 연결되는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)을 구비한 이중 칼럼밸브(400)와, 비연속적 시료 분획 및 통합유닛(200)과 이중 칼럼밸브(400) 사이에 마련되어 비연속적 시료 분획 및 통합유닛(200)에서 순차로 공급되는 복수의 분획시료를 교대로 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 공급하는 칼럼 선택모듈(300)을 포함한다.

[0038] 도 3 내지 도 5를 참조하면, 본 실시예에 따른 비연속적 시료 분획 및 통합유닛(200)은 시료 주입기(S)로부터 연속적으로 공급받은 시료로부터 복수의 분획시료를 획득하는 역할을 한다.

[0039] 본 실시예에 따른 복수의 분획시료에 대하여 설명하면 다음과 같다.

[0040] 먼저, 시료를 공급받는 총 시료공급시간을 복수 개로 균등분할한 단위 시료공급시간을 설정한다. 그리고, 복수의 단위 시료공급시간 각각을 복수 개로 균등분할한 단위 분획구간을 설정한다. 그리고 복수의 분획시료는 각각의 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 동안 공급받은 시료를 통합 저장하여 획득한다.

[0041] 예를 들어, 총 시료공급시간이 100분인 경우에 총 시료공급시간을 5개로 균등분할한 단위 시료공급시간은 각각 20분 간격이다. 즉 제1 단위 시료공급시간은 0~20분이며, 제2 내지 제5 단위 시료공급시간은 각각 20~40분, 40~60분, 60~80분, 80~100분에 해당된다.

[0042] 그리고, 제1 내지 제5 단위 시료공급시간은 10개로 균등분할한 단위 분획구간을 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 단위 시료공간시간 동안 제1 단위 분획구간은 0~2분이며, 제2 내지 제10 단위 분획구간은 각각 2~4분, 4~6분, 6~8분, 8~10분, 10~12분, 12~14분, 14~16분, 16~18분, 18~20분에 해당된다. 그리고, 제2 단위 시료공간시간 동안 제1 단위 분획구간은 20~22분이며, 제2 내지 제10 단위 분획구간은 각각 22~24분, 24~26분, 26~28분, 28~30분, 30~32분, 32~34분, 34~36분, 36~38분, 38~40분에 해당된다.

[0043] 본 실시예에서는 제1 내지 제5 단위 시료공급시간 내의 대응되는 제1 내지 제10 단위 분획구간 동안 공급받은 시료를 통합 저장하여 복수의 분획시료를 얻는 것이다. 예를 들어, 제1 단위 시료공급시간 내지 제5 단위 시료공급시간 내의 제1 단위 분획구간(즉, 0~2분, 20~22분, 40~42분, 60~62분, 80~82분)에 공급되는 시료를 통합 저장하여 제1 분획시료를 얻는 것이다. 제2 분획시료 내지 제10 분획시료는 제1 분획시료를 획득하는 과정과 동일하므로 이에 대한 상세한 설명은 생략하기로 한다.

[0044] 또한, 본 실시예에서는 총 시료공급시간을 100분으로 설정하고, 제1 내지 제5 단위 시료공급시간으로 설정하며, 각각의 단위 시료공급시간을 10개의 단위 분획구간으로 설정하였으나, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니며 총 시료공급시간, 단위 시료공급시간 및 단위 분획구간은 다양하게 설정가능하다.

[0045] 본 실시예에 따른 비연속적 시료 분획 및 통합유닛(200)은 시료를 공급하는 시료 공급모듈(210)과, 시료 공급모

듈(210)에 연결되어 시료 공급모듈(210)로부터 시료를 연속적으로 공급받아 복수의 분획시료를 획득하고 칼럼 선택모듈(300)에 복수의 분획시료를 순차로 공급하는 시료 분획모듈(250)을 포함한다.

[0046] 본 실시예에 따른 시료 공급모듈(210)은 시료를 연속적으로 시료 분획모듈(250)에 공급하는 역할을 한다.

[0047] 시료 공급모듈(210)은 제1 용매를 공급하는 제1 펌프(P1)와 시료 주입기(S)가 연결되는 제1 시료 공급밸브(220)와, 제1 시료 공급밸브(220)에 연결되며 제1 시료 공급밸브(220)로부터 시료를 공급받아 시료 분획모듈(250)로 공급하는 제2 시료 공급밸브(240)를 포함한다.

[0048] 제1 시료 공급밸브(220)는 시료 주입기(S)로부터 시료를 공급받아 시료 저장루프(221)에 저장한 후 제1 펌프(P1)로부터 제1 용매를 공급받아 시료 저장루프(221)에 저장된 시료를 제2 시료 공급밸브(240)로 공급하는 역할을 한다.

[0049] 이를 위해 제1 시료 공급밸브(220)는 시료 주입기(S)에 연결되는 제1 시료 유입포트(222)와, 제1 시료 유입포트(222)에 인접하게 마련되는 제1 시료 배출포트(223)와, 제1 펌프(P1)에 연결되는 제1 용매 유입포트(226)와, 제1 용매 유입포트(226)에 인접하게 마련되며 제2 시료 공급밸브(240)에 연결되는 제1 용매 배출포트(227)와, 시료 저장루프(221)의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트(224)와 제2 시료 저장루프 연결포트(225)를 포함한다.

[0050] 도시되지는 않았으나, 시료 저장루프(221)의 양단에 각각 연결된 제1 시료 저장루프 연결포트(224)와 제2 시료 저장루프 연결포트(225)가 각각 제1 시료 유입포트(222)와 제1 시료 배출포트(223)에 연결된 상태에서 시료 주입기(S)를 통해 시료가 제1 시료 유입포트(222)로 공급되고 시료 저장루프(221)에 연속적으로 저장된다.

[0051] 그리고, 제1 시료 저장루프 연결포트(224)와 제2 시료 저장루프 연결포트(225)가 각각 제1 용매 유입포트(226)와 제1 용매 배출포트(227)에 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)를 통해 제1 용매 유입포트(226)에 제1 용매를 주입하고 시료 저장루프(221)에 저장된 시료를 제2 시료 공급밸브(240)에 연속적으로 공급한다. 이때, 제1 펌프(P1)는 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 수용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in water)인 A용액 99%와 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 아세토니트릴 용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in acetonitrile)인 B용액 1%가 혼합된 용액으로 ph 7.5를 가지는 제1 용매를 제1 용매 유입포트(226)에 공급한다.

[0052] 또한, 제2 시료 공급밸브(240)는 제1 시료 공급밸브(220)에서 공급된 시료를 시료 분리칼럼(243)에 연속적으로 주입하고 시료 분리칼럼(243)에 주입된 시료를 시료 분획모듈(250)로 연속적으로 공급하는 역할을 한다.

[0053] 제2 시료 공급밸브(240)는 제1 용매 배출포트(227)에 연결되는 제2 시료 유입포트(241)와, 제2 시료 유입포트(241)에 인접하게 마련되며 제1 분획시료 유입포트(261)에 연결되는 제2 시료 배출포트(242)와, 제2 시료 유입포트(241)와 제2 시료 배출포트(242)에 양단이 각각 연결되며 제2 시료 배출포트(242)로 시료가 분리 용출되는 시료 분리칼럼(243)을 포함한다.

[0054] 시료 저장루프(221)에 저장된 시료는 제1 용매에 의해 제1 용매 배출포트(227)와 제2 시료 유입포트(241)를 통해 시료 분리칼럼(243)에 주입된다. 그리고, 시료 분리칼럼(243)에 주입된 시료는 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매에 의해 분리 용출된 후 제2 시료 배출포트(242)를 따라 후술할 시료 분획모듈(250)로 공급된다. 이때, 제1 펌프(P1)는 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 수용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in water)인 A용액이 99%에서 50%로 감소되고 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 아세토니트릴 용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in acetonitrile)인 B용액이 1%에서 50%로 증가되는 혼합 용액인 제1 용매를 제1 용매 유입포트(226)에 공급한다. 이처럼, 제1 용매의 B용액의 농도를 점차 증가시켜 시료 분리칼럼(243)에서 시료가 용이하게 용출되게 한다.

[0055] 본 실시예에 따른 시료 분획모듈(250)은 시료 공급모듈(210)에서 연속적으로 공급된 시료로부터 10개의 분획시료를 획득하는 역할을 한다.

[0056] 시료 분획모듈(250)은 시료 공급모듈(210)에 연결되어 시료가 유입되는 제1 분획밸브(260)와, 제1 분획밸브(260)에 인접하게 마련되는 제2 분획밸브(280)와, 일단이 제1 분획밸브(260)에 연결되고 타단이 제2 분획밸브(280)에 연결되는 복수의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)를 포함한다.

[0057] 본 실시예에서 각각의 단위 시료공급시간은 10개의 단위 분획구간을 가지므로 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)는 단위 시료공급시간 내의 대응되는 단위 분획구간 개수에 대응되게 10개 마련된다.

[0058] 그리고, 제1 분획밸브(260)는 제2 시료 배출포트(242)로부터 시료가 유입되는 제1 분획시료 유입포트(261)와,

제1 분획시료 유입포트(261)에 인접하게 마련되며 복수의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)의 일단에 각각 연결되는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262)와, 단위 분획구간에 대응하여 제1 분획시료 유입포트(261)와 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262) 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제1 연결바(263)를 포함한다. 본 실시예에서 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262)는 10개의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)의 개수에 대응하여 10개 마련된다.

[0059] 또한, 제2 분획밸브(280)는 복수의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)의 타단이 각각 연결되는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)와, 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)에 인접하게 마련되며 복수의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j) 중 어느 하나의 타단에 연결되어 분획시료가 배출되는 제1 분획시료 배출포트(281)와, 단위 분획구간에 대응하여 제1 분획시료 배출포트(281)와 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282) 중 어느 하나를 상호 연통되게 연결하는 제2 연결바(283)를 포함한다. 본 실시예에서 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)는 10개의 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)의 개수에 대응하여 10개 마련된다.

[0060] 먼저, 제1 단위 시료공급시간(0~20분) 내의 제1 단위 분획구간 내지 제10 단위 분획구간에서 제1 내지 제10 분획시료를 획득하는 과정을 설명하면 다음과 같다.

[0061] 도 3에서 도시한 바와 같이 제1 단위 분획구간(0~2분)에서 제1 분획시료를 획득하는 동작은 다음과 같다.

[0062] 제1 연결바(263)는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262) 중 제1 분획시료 저장루프(284a)의 일단에 연결된 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262)에 연결되고, 제2 연결바(283)는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282) 중 제1 분획시료 저장루프(284a)의 타단에 연결되는 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)에 연결된다.

[0063] 그리고, 제1 용매 배출포트(227)와 제2 시료 유입포트(241)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 시료 분리칼럼(243)으로 공급하여 시료 분리칼럼(243)에서 시료를 분리 용출시키며, 시료 분리칼럼(243)에서 분리 용출된 시료를 제2 시료 배출포트(242)를 통해 제1 분획시료 유입포트(261)를 거쳐 제1 분획시료 저장루프(284a)에 공급하여 저장한다.

[0064] 또한, 도 4에서 도시한 바와 같이 제2 단위 분획구간(2~4분)에서 제2 분획시료를 획득하는 동작은 다음과 같다.

[0065] 제1 연결바(263)는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262) 중 제2 분획시료 저장루프(284b)의 일단에 연결된 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262)에 연결되고, 제2 연결바(283)는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282) 중 제2 분획시료 저장루프(284b)의 타단에 연결되는 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)에 연결된다.

[0066] 그리고, 제1 용매 배출포트(227)와 제2 시료 유입포트(241)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 시료 분리칼럼(243)으로 공급하여 시료 분리칼럼(243)에서 시료를 분리 용출시키며, 시료 분리칼럼(243)에서 분리 용출된 시료를 제2 시료 배출포트(242)를 통해 제1 분획시료 유입포트(261)를 거쳐 제2 분획시료 저장루프(284b)에 공급하여 저장한다.

[0067] 또한, 도 5에서 도시한 바와 같이 제10 단위 분획구간(18~20분)에서 제10 분획시료를 획득하는 동작은 다음과 같다.

[0068] 제1 연결바(263)는 복수의 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262) 중 제10 분획시료 저장루프(284j)의 일단에 연결된 제1 분획시료 저장루프 연결포트(262)에 연결되고, 제2 연결바(283)는 복수의 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282) 중 제10 분획시료 저장루프(284j)의 타단에 연결되는 제2 분획시료 저장루프 연결포트(282)에 연결된다.

[0069] 그리고, 제1 용매 배출포트(227)와 제2 시료 유입포트(241)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 시료 분리칼럼(243)으로 공급하여 시료 분리칼럼(243)에서 시료를 분리 용출시키며, 시료 분리칼럼(243)에서 분리 용출된 시료를 제2 시료 배출포트(242)를 통해 제1 분획시료 유입포트(261)를 거쳐 제10 분획시료 저장루프(284j)에 공급하여 저장한다.

[0070] 그리고, 제2 내지 제5 단위 시료공급시간(20~40분, 40~60분, 60~80분, 80~100분)에서 상기한 제1 단위 시료공급시간(0~20분) 내의 제1 단위 분획구간 내지 제10 단위 분획구간에서 제1 내지 제10 분획시료를 획득하는 과정을 반복하여 제1 내지 제10 분획시료를 획득할 수 있다. 예를 들어 제1 단위 시료공급시간 내지 제5 단위 시료공급시간 내의 제1 단위 분획구간(즉, 0~2분, 20~22분, 40~42분, 60~62분, 80~82분)에 공급되는 시료를 통합 저장하

여 제1 분획시료를 얻는 것이다.

[0071] 한편, 상기한 시료 분획모듈(250)에서 획득한 제1 내지 제10 분획시료에 대한 분리 분석을 위해 제1 내지 제10 분획시료를 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 공급한다.

[0072] 이를 위해 본 실시예에 따른 칼럼 선택모듈(300)은 시료 분획모듈(250)에서 순차로 공급되는 제1 내지 제10 분획시료를 교대로 후술할 이중 칼럼밸브(400)에 구비된 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 공급하는 역할을 한다.

[0073] 또한, 칼럼 선택모듈(300)은 제1 내지 제10 분획시료를 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2) 중 어느 하나에 공급하여 분획시료에 대한 분리 분석과정을 수행하는 동안 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2) 중 나머지 하나에 대한 평형화 과정을 동시에 수행하는 역할을 한다.

[0074] 이러한 칼럼 선택모듈(300)은 제1 분획시료 배출포트(281)에 연결되며 복수의 분획시료를 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 교대로 공급하는 경로를 제공하고 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 교대로 평형화하는 칼럼 평형화밸브(310)와, 칼럼 평형화밸브(310)에 연결되어 복수의 분획시료를 공급받아 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 교대로 공급하며 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에서 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 분획시료가 분리 용출되거나 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 분획시료가 분리 용출되게 하는 칼럼 선택밸브(330)를 포함한다.

[0075] 본 실시예에 따른 칼럼 평형화밸브(310)는 제1 내지 제10 분획시료가 교대로 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 공급되는 경로를 제공하는 역할을 한다.

[0076] 칼럼 평형화밸브(310)는 제1 분획시료 배출포트(281)와 제2 용매를 공급하는 제2 펌프(P2)에 연결되는 제2 분획시료 유입포트(311)와, 제3 용매를 공급하는 제3 펌프(P3)에 연결되어 제3 용매가 유입되는 제3 용매 유입포트(313)와, 제2 분획시료 유입포트(311)에 인접하게 마련되어 제2 분획시료 유입포트(311)와 제3 용매 유입포트(313)에 선택적으로 연결되는 제2 분획시료 배출포트(312)와, 제3 용매 유입포트(313)에 인접하게 마련되어 제2 분획시료 유입포트(311)와 제3 용매 유입포트(313)에 선택적으로 연결되는 제3 용매 배출포트(334)를 포함한다.

[0077] 도 6을 참조하면 제2 분획시료 유입포트(311)는 제1 분획시료 배출포트(281)와 연결되고 제2 분획시료 유입포트(311)가 제3 용매 배출포트(334)와 연결된 상태에서 제1 분획시료 저장루프(284a)에 저장된 제1 분획시료가 후술할 이중 선택밸브의 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에 공급된다. 또한 도 8을 참조하면 제2 분획시료 유입포트(311)는 제1 분획시료 배출포트(281)와 연결되고 제2 분획시료 유입포트(311)가 제3 용매 배출포트(334)와 연결된 상태에서 제2 분획시료 저장루프(284b)에 저장된 제2 분획시료가 후술할 이중 선택밸브의 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 공급된다.

[0078] 상기와 같이 제1 내지 제10 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)에 저장된 제1 내지 제10 분획시료는 제1 분획시료 배출포트(281)와 제2 분획시료 유입포트(311)와 제3 용매 배출포트(334)와 연결된 상태에서 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 교대로 공급될 수 있다.

[0079] 이때, 제1 내지 제10 분획시료 저장루프(284a 내지 284j)에서 배출되는 제1 내지 제10 분획시료는 제1 분획시료 배출포트(281)와 제2 분획시료 유입포트(311)를 연결하는 라인 상에 배치된 제2 펌프(P2)를 통해 제2 용매를 공급받는다. 여기서, 제2 펌프(P2)는 0.2% 트리플루오로아세트산 수용액(0.2% Trifluoroacetic acid (TFA) in water)인 제2 용매를 공급한다. 그리고, 제1 펌프(P1)는 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 수용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in water)인 A용액 99%와 10mM 중탄산 트리에틸암모늄 아세토니트릴 용액(10 mM Triethylammonium bicarbonate(TEAB) in acetonitrile)인 B용액 1%가 혼합된 용액인 제1 용매를 제1 용매 유입포트(226)에 공급한다. 또한, 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 제2 펌프(P2)에서 공급되는 제2 용매의 유량의 비는 1:9일 수 있다.

[0080] 이는 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 공급되는 제1 내지 제10 분획시료에 제2 용매를 주입하여 제1 내지 제10 분획시료를 희석하여 산성화시켜 제1 내지 제10 분획시료가 제1 고체상 추출칼

럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 유실되는 것을 방지하고 유기용매의 조성을 낮추기 위함이다.

[0081] 그리고, 도 7을 참조하면, 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)에 저장된 제1 분획시료에 대한 분리 분석과정을 수행하는 동안 제3 용매 유입포트(313)와 제3 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제3 용매가 칼럼 선택밸브(330)를 거쳐 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화한다. 또한, 도 9를 참조하면, 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 저장된 제2 분획시료에 대한 분리 분석과정을 수행하는 동안 제3 용매 유입포트(313)와 제3 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제3 용매가 칼럼 선택밸브(330)를 거쳐 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)을 평형화한다.

[0082] 본 실시예에서 제3 용매는 0.1 % 포름산 수용액(0.1% Formic acid in water)이 사용되나, 이에 한정되지 않고 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 및 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화할 수 있는 수용성 용액이면 어느 것이든 사용가능하다.

[0083] 본 실시예에 따른 칼럼 선택밸브(330)는 칼럼 평형화밸브(310)로부터 복수의 분획시료를 공급받고 복수의 분획시료를 교대로 제1 고체상 추출칼럼(SPE1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 공급하는 역할을 한다. 또한, 칼럼 선택밸브(330)는 제4 용매를 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에 공급하여 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에서 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 분획시료가 용출되게 하거나 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 공급하여 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 분획시료가 용출되게 하는 역할을 한다.

[0084] 칼럼 선택밸브(330)는 제3 용매 배출포트(334)에 연결되어 분획시료 또는 제3 용매가 유입되는 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와, 제4 용매를 공급하는 제4 펌프(P4)에 연결되어 제4 용매가 유입되는 제4 용매 유입포트(333)와, 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)에 인접하게 마련되어 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제4 용매 유입포트(333)에 선택적으로 연결되는 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)와, 제4 용매 유입포트(333)에 인접하게 마련되어 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제4 용매 유입포트(333)에 선택적으로 연결되는 제4 용매 배출포트(334)를 포함한다.

[0085] 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화하는 동작을 살펴보면, 도 6에서 도시한 바와 같이 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)와 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제3 용매 배출포트(334)와 제2 분획시료 유입포트(311)가 연결된 상태에서 제1 분획시료가 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)으로 공급된다. 그리고, 도 7에서 도시한 바와 같이 제4 용매 유입포트(333)와 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)가 연결된 상태에서 제4 용매가 제1 분획시료를 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에서 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 용출하고 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제4 용매 배출포트(334)와 제3 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제3 용매가 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 유입되어 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화한다.

[0086] 본 실시예에서 제4 펌프(P4)는 0.1% 포름산 수용액(0.1% Formic acid in water)인 C용액이 99%에서 60%로 감소되고 0.1% 포름산 아세토니트릴 용액(0.1% Formic acid in actonitrile)인 D용액이 1%에서 40%로 증가되는 혼합 용액인 제4 용매를 제4 용매 유입포트(333)에 공급한다. 이처럼, 제4 용매의 D용액의 농도를 점차 증가시켜 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에서 제1 분획시료가 용이하게 용출되게 하거나 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 제2 분획시료가 용이하게 용출되게 한다.

[0087] 또한, 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)을 평형화하는 동작을 살펴보면, 도 8에서 도시한 바와 같이 제4 용매 배출포트(334)와 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제3 용매 배출포트(334)와 제2 분획시료 유입포트(311)가 연결된 상태에서 제2 분획시료가 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 공급된 후, 도 9에서 도시한 바와 같이 제4 용매 유입포트(333)와 제4 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제4 용매가 제2 분획시료를 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 용출하고 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)가 연결된 상태에서 제3 용매가 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 유입되어 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)을 평형화한다.

[0088] 한편, 본 실시예에 따른 이중 칼럼밸브(400)는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2) 중 어느 하나에서 분획시료에 대한 분리 분석이 진행되는 동안 다른 칼럼에 대한 평형화를 수행하도록 하는 역할을 한다.

[0089] 이중 칼럼밸브(400)는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)에 연결되는 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제2

역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 연결되는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)을 포함한다. 분획시료는 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)을 통해 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)을 통해 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 공급된다.

[0090] 그리고, 이중 칼럼밸브(400)는 제1 내지 제10 분획시료가 교대로 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 공급되게 하며, 또한 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2) 중 어느 하나에서 분획시료에 대한 분리 분석이 진행되는 동안 동시에 다른 칼럼에 대한 평형화가 수행되도록 하는 칼럼 선택밸브(330)와 유체 연통된다.

[0091] 이를 위해, 이중 칼럼밸브(400)는 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)와, 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)와 연결되되 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출칼럼 유입포트(411)와, 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)에 연결되며 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)에 연결 또는 연결해제되는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(414)과, 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)와, 제4 용매 배출포트(334)와 연결되되 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출칼럼 유입포트(431)와, 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 연결되며 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)에 연결 또는 연결해제되는 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(434)를 포함한다.

[0092] 도 6을 참조하여 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에 제1 분획시료가 공급되는 동작을 살펴보면, 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)와 제1 고체상 추출칼럼 유입포트(411)와 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)와 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제3 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제1 분획시료가 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)으로 공급된다. 그리고, 이중 칼럼밸브(400)는 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)에 인접하게 마련되어 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)에 연결 또는 연결해제되는 제1 배출포트(451)를 더 포함하며, 제1 분획시료가 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에 공급되어 농축되는 경우에 염들은 제1 배출포트(451)를 통해 외부로 빠져나가게 된다.

[0093] 그리고, 도 7을 참조하여 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)에 제1 분획시료를 주입하여 제1 분획시료에 대한 분리 분석을 진행하기 위해, 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(414)와 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)와 제1 고체상 추출칼럼 유입포트(411)가 연결된 상태에서 제4 용매가 제4 용매 유입포트(333)와 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)를 따라 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)으로 유입되어 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)에서 제1 분획시료를 용출하고 제1 분획시료를 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 공급한다. 또한, 제1 분획시료에 대한 분리 분석과 동시에 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화하기 위해, 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(434)와 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)와 제2 고체상 추출칼럼 유입포트(431)가 연결된 상태에서 제3 용매가 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제4 용매 배출포트(334)를 따라 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 유입되어 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)을 평형화한다.

[0094] 또한, 도 8을 참조하여 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 제2 분획시료가 공급되는 동작을 살펴보면, 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)와 제2 고체상 추출칼럼 유입포트(431)와 제4 용매 배출포트(334)와 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 제3 용매 배출포트(334)가 연결된 상태에서 제2 분획시료가 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 공급된다. 그리고, 이중 칼럼밸브(400)는 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)에 인접하게 마련되어 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트(453)를 더 포함하며, 제2 분획시료가 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에 공급되어 농축되는 경우에 염들은 제2 배출포트(453)를 통해 외부로 빠져나가게 된다.

[0095] 그리고, 도 9를 참조하여 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 제2 분획시료를 주입하여 제2 분획시료에 대한 분리 분석을 진행하기 위해, 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(434)와 제2 고체상 추출칼럼 연결포트(432)와 제2 고체상 추출칼럼 경로포트(433)와 제2 고체상 추출칼럼 유입포트(431)가 연결된 상태에서 제4 용매가 제4 용매 유입포트(333)와 제4 용매 배출포트(334)를 따라 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)으로 유입되어 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)에서 제2 분획시료를 용출하고 제2 분획시료를 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 공급한다.

[0096] 또한, 제2 분획시료에 대한 분리 분석과 동시에 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)을 평형화하기 위해, 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼포트(414)와 제1 고체상 추출칼럼 연결포트(412)와 제1 고체상 추출칼럼 경로포트(413)와 제1 고체상 추출칼럼 유입포트(411)가 연결된 상태에서 제3 용매

가 분획시료 및 제3 용매 유입포트(331)와 분획시료 및 제3 용매 배출포트(332)를 따라 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)으로 유입되어 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1)을 평형화한다.

[0097] 상기와 같은 방식으로 제3 내지 제10 분획시료를 교대로 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)으로 공급하여 분리 분석을 함과 동시에 제1 고체상 추출칼럼(SPE1)과 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL1) 또는 제2 고체상 추출칼럼(SPE2)과 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼(COL2)에 대한 평형화를 할 수 있다.

[0098] 이와 같이 본 발명은 기재된 실시 예에 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양하게 수정 및 변형할 수 있음은 이 기술의 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다. 따라서 그러한 수정 예 또는 변형 예들은 본 발명의 특허청구범위에 속한다 하여야 할 것이다.

부호의 설명

[0099] 100: 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치

200: 비연속적 시료 분획 및 통합유닛 210: 시료 공급모듈

220: 제1 시료 공급밸브 240: 제2 시료 공급밸브

250: 시료 분획모듈 260: 제1 분획밸브

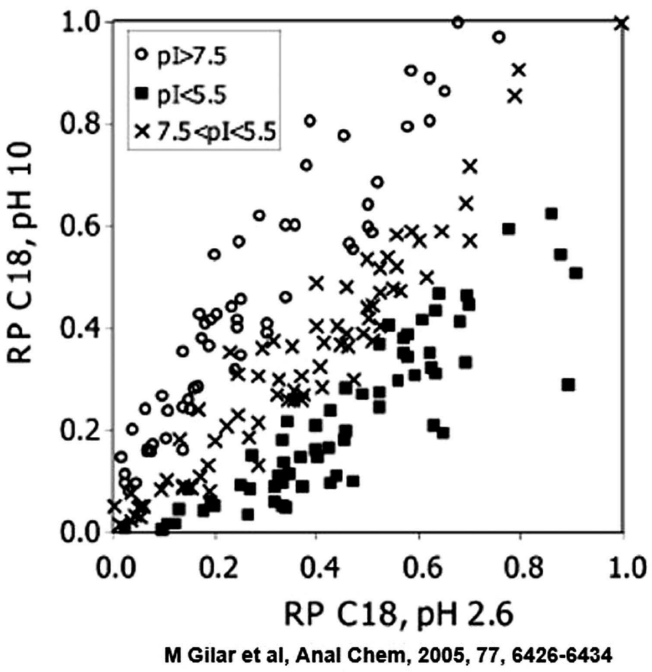
280: 제2 분획밸브 300: 칼럼 선택모듈

310: 칼럼 평형화밸브 330: 칼럼 선택밸브

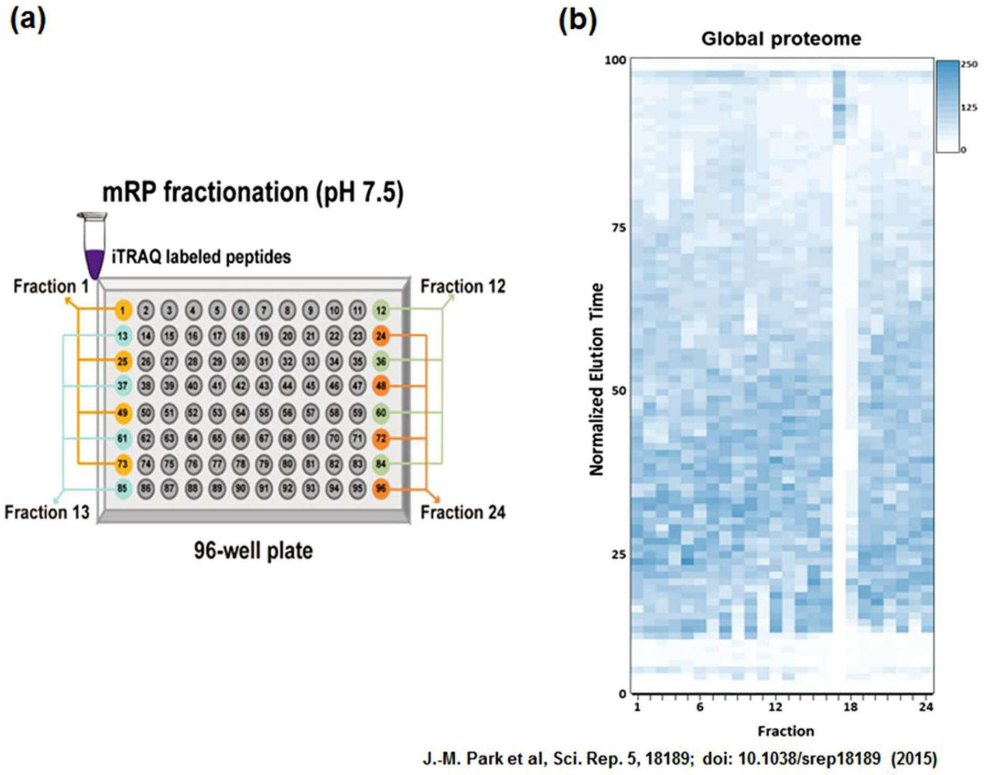
400: 이중 칼럼밸브

도면

도면1

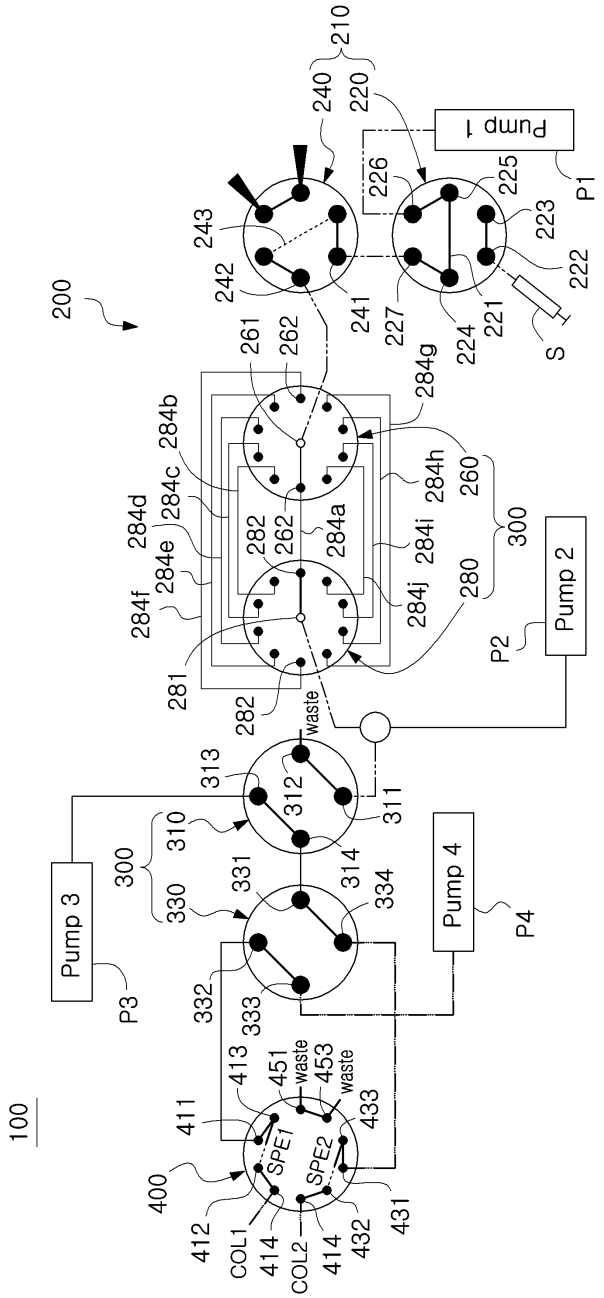


도면2

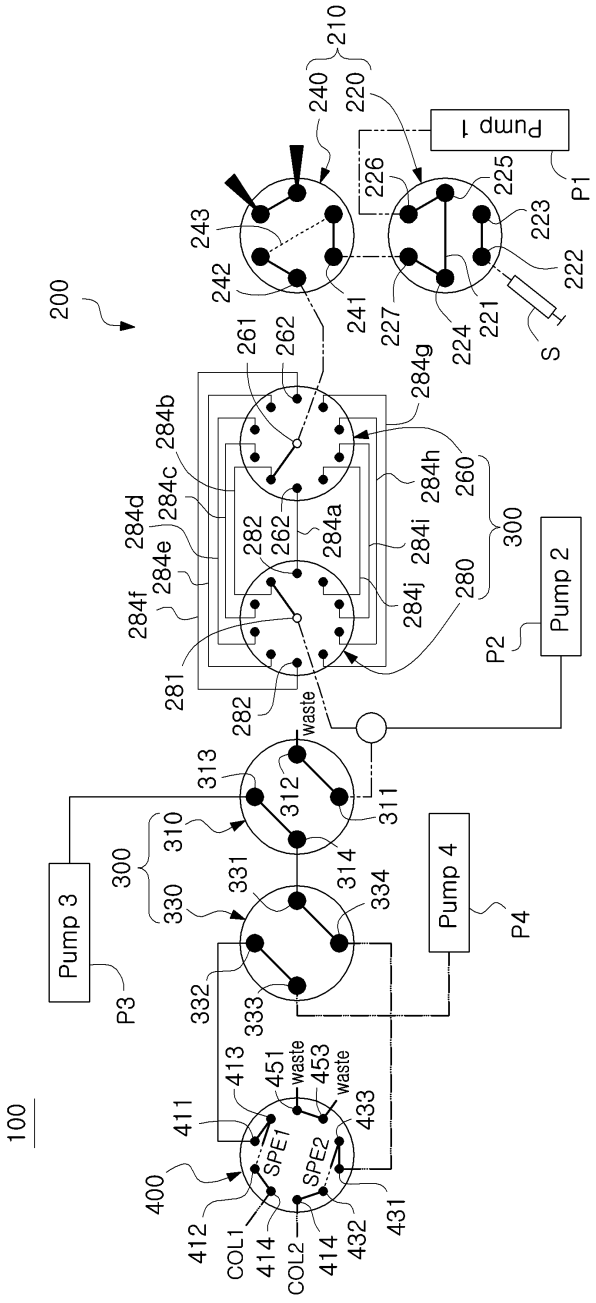


J.-M. Park et al, Sci. Rep. 5, 18189; doi: 10.1038/srep18189 (2015)

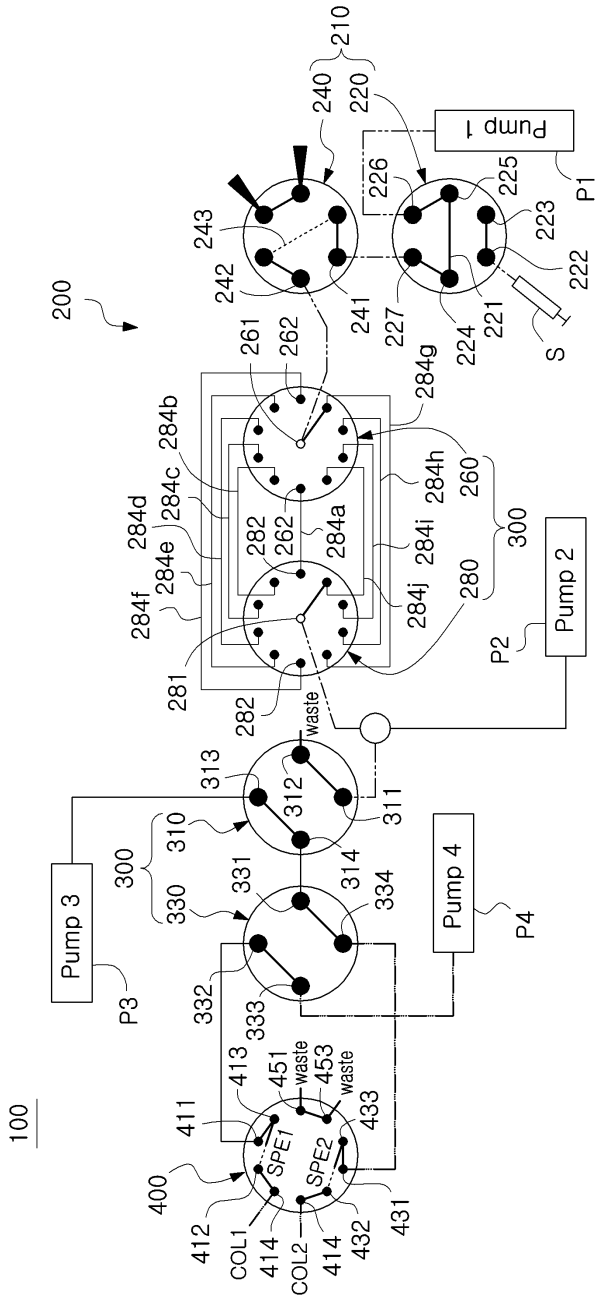
도면3


100
200
Pump 1
P1
Pump 2
P2
Pump 3
P3
Pump 4
P4
waste
SPE1
SPE2
COL1
COL2
S

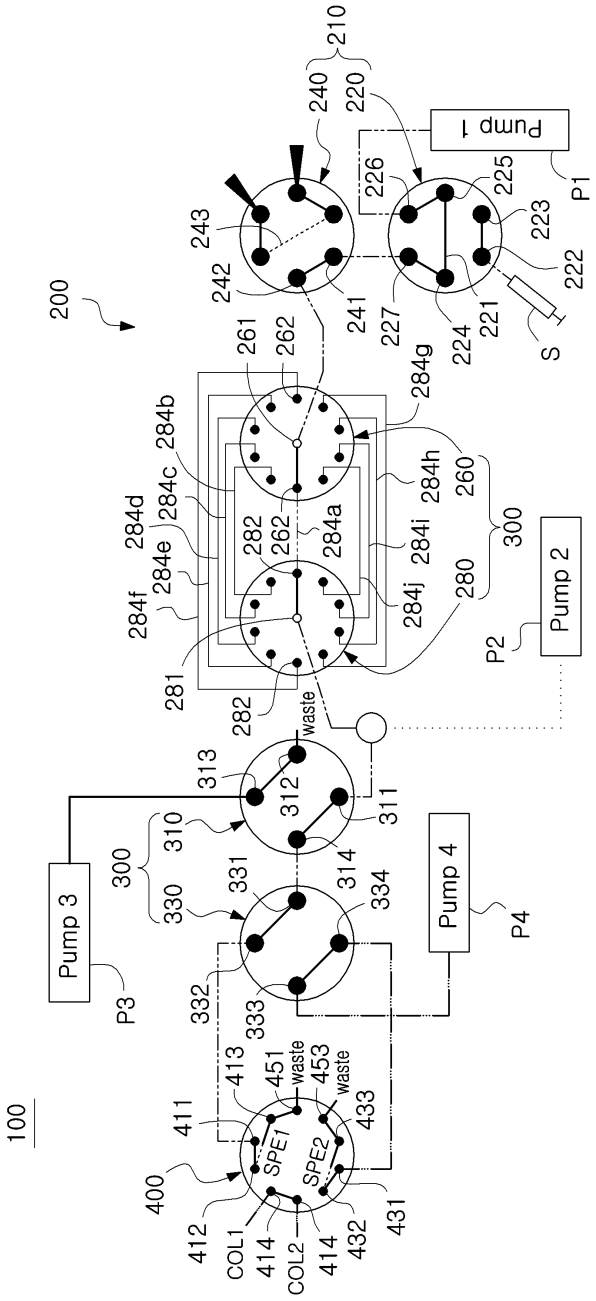
도면4


100
200
210
240
220
Pump 1
P1
226
225
223
222
243
242
241
227
224
221
S
261
262
284g
284b
284c
284d
284e
284f
282
262
284a
284h
284i
284j
260
300
280
281
282
waste
Pump 2
P2
313
312
311
310
300
330
331
314
334
Pump 3
P3
Pump 4
P4
332
333
413
451
waste
453
waste
411
433
400
412
COL1
414
SPE1
SPE2
COL2
414
432
431

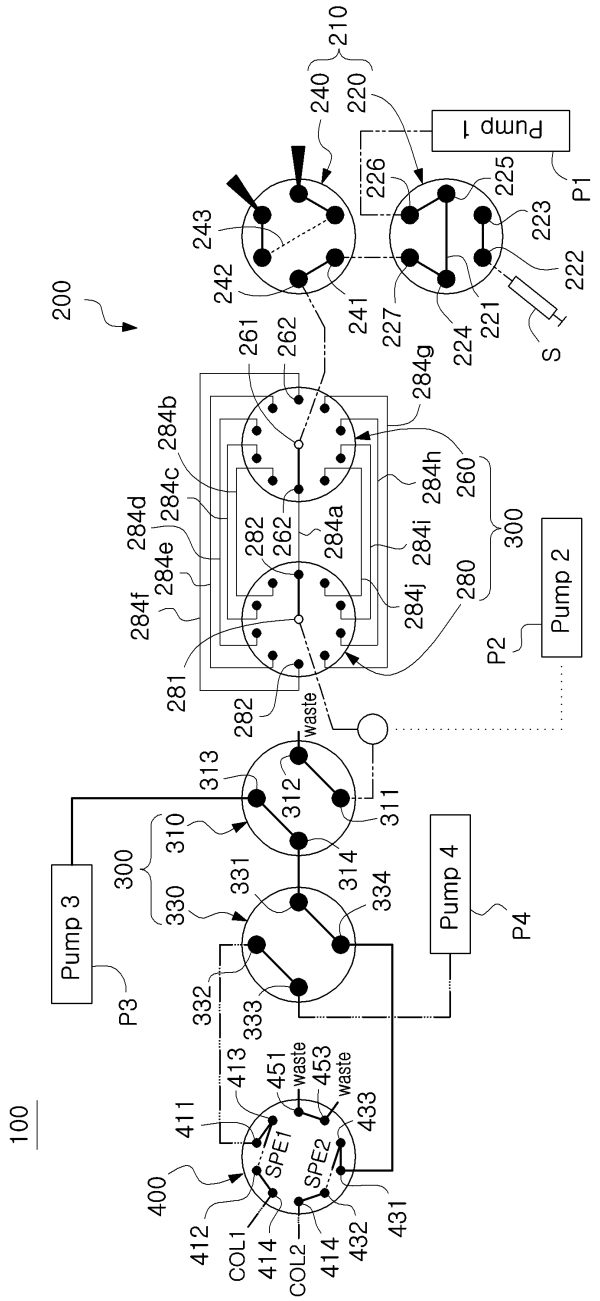
도면5


100
200
Pump 1
P1
Pump 2
P2
Pump 3
P3
Pump 4
P4
waste
SPE1
SPE2
COL1
COL2
S

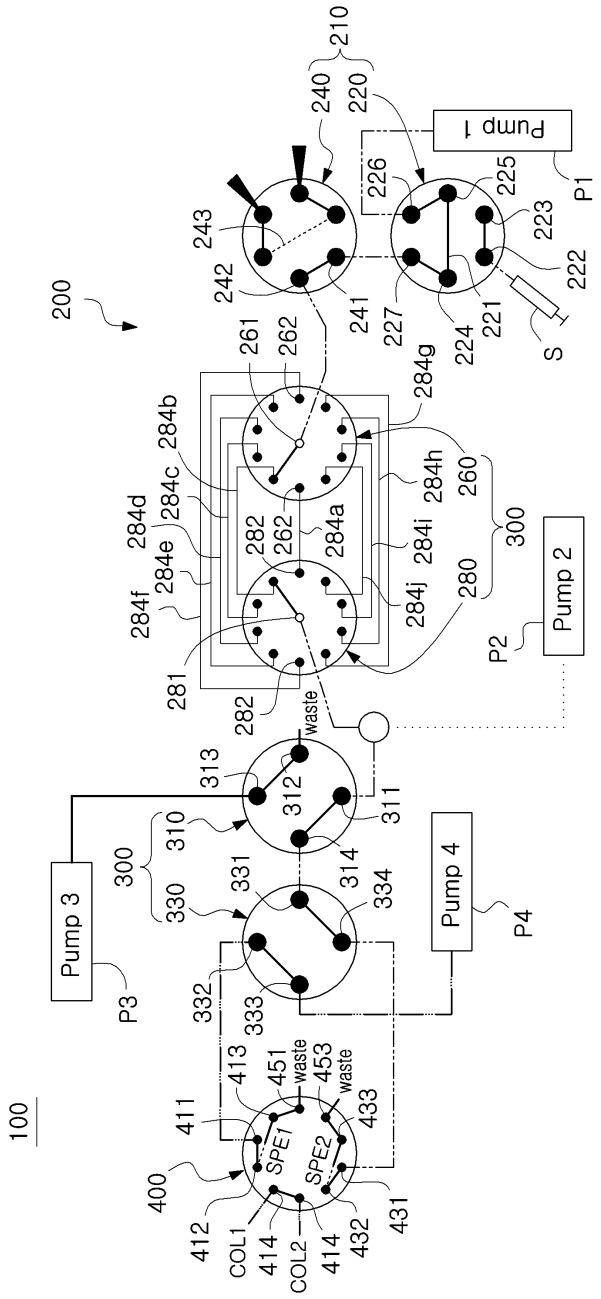
도면6


100
200
210
220
240
Pump 1
P1
226
225
223
222
221
224
227
241
242
243
S
261
262
284g
284b
284c
284d
284e
284f
284h
284i
284j
284a
282
260
300
280
Pump 2
P2
281
waste
313
312
311
310
314
Pump 3
P3
330
331
334
Pump 4
P4
332
333
413
451
453
411
433
400
SPE1
SPE2
412
COL1
414
COL2
432
431

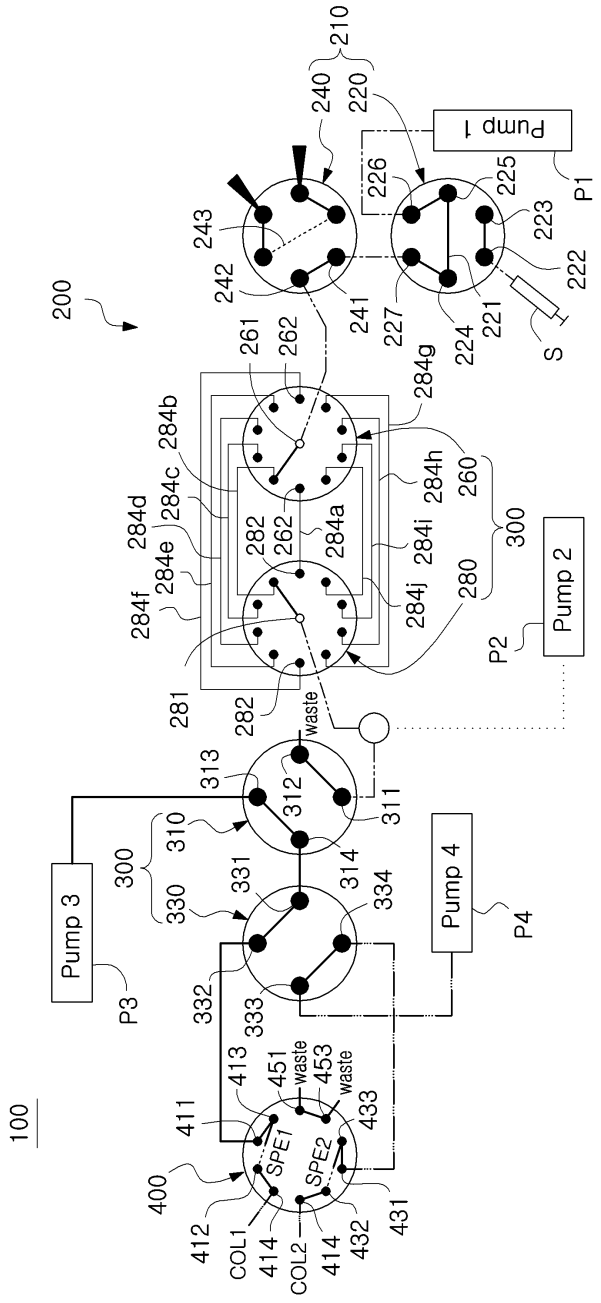
도면7


100
200
Pump 1
P1
Pump 2
P2
Pump 3
P3
Pump 4
P4
waste
SPE1
SPE2
COL1
COL2
S

도면8


100
200
Pump 1
P1
Pump 2
P2
Pump 3
P3
Pump 4
P4
waste
SPE1
SPE2
COL1
COL2
S

도면9


100
200
Pump 1
P1
Pump 2
P2
Pump 3
P3
Pump 4
P4
waste
SPE1
SPE2
COL1
COL2
S