



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0085268
(43) 공개일자 2011년07월27일

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01) B01D 15/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0004950

(22) 출원일자 2010년01월19일

심사청구일자 2010년01월19일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이상원

서울 성북구 안암동1가 안암래미안아파트 106동 503호

김민식

서울특별시 광진구 구의1동 237-14

형석원

서울특별시 성북구 안암동5가 고려대학교자연계캠퍼스 아산이학관 224호

(74) 대리인

특허법인충현

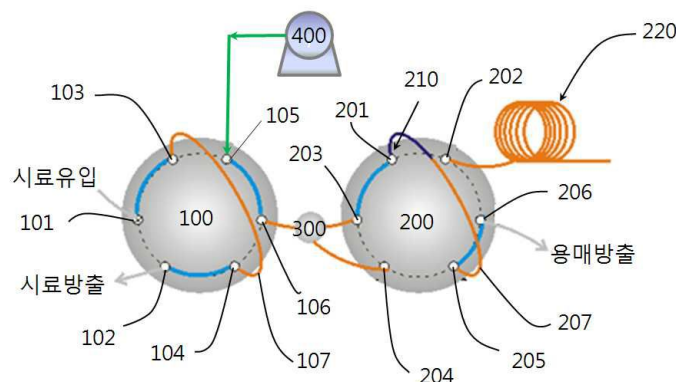
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 액체 크로마토그래피 장치

(57) 요약

본 발명은 액체 크로마토그래피 장치에 관한 것으로서, 분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트, 시료 방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 시료유입밸브; 고체상 추출칼럼 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트, 제1 용매유입포트, 제2 용매유입포트, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 용매방출포트를 포함하는 트랩밸브; 및 상기 시료유입밸브로부터 유출된 용매의 흐름을 상기 트랩밸브의 제1 용매유입포트 및 제2 용매유입포트로 분리하는 용매분리부;를 포함하며, 이를 통해 시료의 주입방향과 시료의 용출방향을 상호 역방향으로 함으로써 분리 분해능을 높이고 고재현성을 가지는 액체 크로마토그래피 장치를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K000114

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업

연구과제명 고효율, 고감도, 고정보력 정량 프로테오믹스 프레임워크 구축 및 적용

기여율

주관기관 한국과학재단

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 시료유입밸브;

고체상 추출칼럼 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트, 제1 용매유입포트, 제2 용매유입포트, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 용매방출포트를 포함하는 트랩밸브; 및

상기 시료유입밸브로부터 유출된 용매의 흐름을 상기 트랩밸브의 제1 용매유입포트 및 제2 용매유입포트로 분리하는 용매분리부;를 포함하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료유입밸브의 상기 용매유출포트와 상기 용매분리부가 서로 유체 연통되어 있는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 시료유입밸브의 상기 용매유입포트에 유체 연통되어 상기 시료유입밸브에 용매를 공급하는 용매공급펌프를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 4

분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 시료유입밸브;

고체상 추출칼럼 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트, 제1 용매유입포트, 제2 용매유입포트, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 용매방출포트를 포함하는 트랩밸브; 및

공급되는 용매의 흐름을 상기 시료유입밸브 및 상기 트랩밸브로 분리하는 용매분리부;를 포함하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 용매분리부는 상기 시료유입밸브의 용매유입포트 및 상기 트랩밸브의 제2 용매유입포트와 유체 연통되고,

상기 시료유입밸브의 용매유출포트는 상기 트랩밸브의 제1 용매유입포트와 유체연통되는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 용매분리부에 유체 연통되어 상기 시료유입밸브 및 상기 트랩밸브 중 적어도 하나에 용매를 공급하는 용매공급펌프를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 7

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 용매분리부는 T-형 용매분리관을 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 8

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 트랩밸브에는 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z-형 용매유로가 형성되는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 9

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 시료유입밸브는,

상기 시료유입포트와 상기 제1 시료저장루프 연결포트가 유체 연통되고, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 시료방출포트가 유체 연통되며, 상기 용매유입포트와 상기 용매유출포트가 유체 연통되는 제1 모드; 및

상기 시료유입포트와 상기 시료방출포트가 유체 연통되고, 상기 제1 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유입포트가 유체 연통되며, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유출포트가 유체 연통되는 제2 모드;를 포함하고,

상기 트랩밸브는,

상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 용매유입포트가 유체 연통되고, 상기 시료이동루프 연결포트와 상기 용매방출포트가 유체 연통되는 제1 모드; 및

상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트와 상기 고체상 추출칼럼 연결포트가 유체 연통되고, 상기 제2 용매 유입포트와 상기 시료이동루프 연결포트가 유체 연통되는 제2 모드를 포함하는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 시료유입밸브가 제1 모드이고 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때, 상기 시료저장루프에 상기 시료가 로딩되는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 시료유입밸브가 제2 모드이고, 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때, 상기 용매를 통해 상기 시료가 상기 고체상 추출칼럼에 주입되는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 시료유입밸브가 제1 모드이고, 상기 트랩밸브가 제2 모드일 때, 상기 용매를 통해 상기 고체상 추출칼럼에 주입된 시료가 상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼에 유입되는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 시료유입밸브가 제2 모드이고 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때 상기 고체상 추출칼럼으로 주입되는 시료의 방향과, 상기 시료유입밸브가 제1 모드이고 상기 트랩밸브가 제2 모드일 때 상기 고체상 추출칼럼에서 용출되는 시료의 방향은 상호 역방향인 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 14

제3항 또는 제6항에 있어서,

상기 용매공급펌프는 5,000 psi 내지 20,000 psi의 압력으로 상기 용매를 공급하는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 15

제3항 또는 제6항에 있어서,

상기 용매공급펌프에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브가 설치된 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

청구항 16

제1항 또는 제4항에 있어서,

상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼은 질량 분석기(mass spectrometer)에 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 액체 크로마토그래피 장치.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 액체 크로마토그래피 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 T-형 용매분리부와 Z-형 용매유로가 형성된 트랩밸브의 특화된 연동을 이용하여 용매의 흐름을 변경시킴으로써 가장 단순한 형태를 가지고, 동시에 시료의 주입방향과 시료의 용출방향을 상호 역방향으로 하여 분리 분해능을 향상시킬 수 있는 액체 크로마토그래피 장치에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 온라인 고체상 추출 및 역상 액체 크로마토그래피(on-line solid phase extraction/capillary reverse-phase liquid chromatography)는 그 분석 효율성이 매우 우수하여 프로테옴 연구에 있어서 매우 중요한 기술로 인식되어지고 있다. 특히, 이는 미세량의 생체 물질을 효과적으로 분리할 수 있고, 분석물-고체상 반응 범위가 넓어서 높은 효율로 미세량의 단백질을 동정하는 것을 가능하게 한다.
- [0003] 단백질을 분석하기 위한 방법으로서 질량 분석법에 기초한 방법(mass spectrometry-base methods)은 프로테옴 연구의 표준 분석 플랫폼이 되고 있으며, 대표적인 예로서 샷건 방법 또는 마탐-업 방법 등은 질량 분석기를 사용한 분석 이전에 단백질을 가수분해하여 펩타이드로 분해하는데, 이러한 가수분해는 생체 시료들의 용해도를 증가시키며 질량 분석기 중에서 용이하게 이온화 및 검출이 가능한 펩타이드 절편들을 생성한다.
- [0004] 그러나, 이러한 공정은 불가피하게 시료의 복잡성을 야기하게 되는 바, 예를 들어 가장 단순한 프로테옴 중의 하나인 효모 프로테옴의 경우에도 약 6,000 여개의 다양한 단백질로부터 300,000개 이상의 펩타이드 절편들이 생성된다. 따라서, 이러한 시료 복잡성을 해결하기 위한 방법으로서, 온-/오프-라인 다차원 단백질 동정 기술(on-/off-line multidimensional protein identification technology)과 같은 다양한 방법들이 개발되었으나 (Link, A. J., Eng, J., Schieltz, D. M., Carmack, E., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 1999, 17, 676-682; Chen, E. I., Hewel, J., Felding-Habermann, B., Yates, J. R. III, *Mol. Cell. Proteomics* 2006, 5, 53-56.), 액체 크로마토그래피 칼럼의 효율성 및 감도를 개선하여야 하는 필요성은 여전히 존재한다. 이때, 액체 크로마토그래피/질량 분석법 실험의 감도는 분리 칼럼의 길이를 일정하게 유지한 채로, 내경을 감소시키는 경우에 급격히 증가될 수 있다는 사실이 알려진 바 있다(Kim, M. -S., Choie, W. -S., Shin, Y. S., Yu, M. H., Lee, S. -W., *Bull. Korean Chem. Soc.* 2004, 25, 1833-1839.).
- [0005] 또한, 상당량의 세제 및 염들을 포함하는 생물 시료의 경우에 있어서, 온-라인 탈염 공정(on-line desalting step)은 질량 분석 이전에 거쳐야 하는 필수적인 과정인데, 이는 이러한 불순물들이 분석하고자 하는 펩티드 시료의 이온화 과정을 방해하여 펩티드 시료에 대한 검출 감도를 떨어뜨리기 때문이다. 이때, 시간 절약 및 시료 손실 등을 감안하면 온-라인 탈염 공정이 오프-라인 탈염 공정보다 유리하다. 또한, 긴 길이 및 작은 내경을 갖는 모세관 칼럼을 소수성 매질로 채우는 경우에는 칼럼 평형화 (또는 재생)을 위해서 장시간이 소요된다는 문제점이 있다. 예를 들어, 1m 길이 및 75 μ m의 내경을 갖는 칼럼을 재사용하기 위해서는 평형화에 적어도 2시간 이상이 소요된다.
- [0006] 한편, 종래의 액체 크로마토그래피 장치는 고체상 추출칼럼이 채용되지 않아 시료의 주입시간이 길어지거나, 고

체상 추출칼럼을 채용하더라도 시료의 주입방향과 시료의 용출방향이 서로 동일하여 분리 분해능이 저하되는 문제점이 있었다.

[0007] 또한, 시료의 주입방향과 시료의 용출방향을 상호 역방향으로 하기 위해(이른바 back flushing), 종래의 액체 크로마토그래피 장치에서는 별도의 밸브 및/또는 펌프를 도입하고 있으나, 이와 같은 접근 방법은 액체 크로마토그래피 장치의 구동을 복잡하게 할 뿐 아니라, 오작동의 가능성을 높이는 문제점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 용매분리부를 이용하여 용매의 흐름을 변화시킴으로써 밸브 또는 펌프의 추가 없이도 시료의 백 플러싱(back flushing)을 가능하게 하여 분리 분해능을 향상시킬 수 있는 액체 크로마토그래피 장치를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여,

[0010] 분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 시료유입밸브;

[0011] 고체상 추출칼럼 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트, 제1 용매유입포트, 제2 용매유입포트, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 용매방출포트를 포함하는 트랩밸브; 및

[0012] 상기 시료유입밸브로부터 유출된 용매의 흐름을 상기 트랩밸브의 제1 용매유입포트 및 제2 용매유입포트로 분리하는 용매분리부;를 포함하는 액체 크로마토그래피 장치를 제공한다.

[0013] 여기서, 상기 시료유입밸브의 상기 용매유출포트와 상기 용매분리부가 서로 유체 연통되어 있는 것이 바람직하다.

[0014] 또한, 상기 시료유입밸브의 상기 용매유입포트에 유체 연통되어 상기 시료유입밸브에 용매를 공급하는 용매공급펌프를 더 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예에 의하면,

[0016] 분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 시료유입밸브;

[0017] 고체상 추출칼럼 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트, 제1 용매유입포트, 제2 용매유입포트, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 용매방출포트를 포함하는 트랩밸브; 및

[0018] 공급되는 용매의 흐름을 상기 시료유입밸브 및 상기 트랩밸브로 분리하는 용매분리부;를 포함하는 액체 크로마토그래피 장치를 제공한다.

[0019] 여기서, 상기 용매분리부는 상기 시료유입밸브의 용매유입포트 및 상기 트랩밸브의 제2 용매유입포트와 유체 연통되고, 상기 시료유입밸브의 용매유출포트는 상기 트랩밸브의 제1 용매유입포트와 유체연통될 수 있다.

[0020] 또한, 상기 용매분리부에 유체 연통되어 상기 시료유입밸브 및 상기 트랩밸브 중 적어도 하나에 용매를 공급하는 용매공급펌프를 더 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 상기 용매분리부는 T-형의 용매분리관을 포함할 수 있다.

[0022] 또한, 상기 트랩밸브에는 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z-형 용매유로가 형성될 수 있다.

[0023] 또한, 상기 시료유입밸브는, 상기 시료유입포트와 상기 제1 시료저장루프 연결포트가 유체 연통되고, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 시료방출포트가 유체 연통되며, 상기 용매유입포트와 상기 용매유출포트가 유체 연통되는 제1 모드; 및 상기 시료유입포트와 상기 시료방출포트가 유체 연통되고, 상기 제1 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유입포트가 유체 연통되며, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유출포트가 유체 연통

되는 제2 모드;를 포함하고,

- [0024] 상기 트랩밸브는, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 용매유입포트가 유체 연통되고, 상기 시료이동루프 연결포트와 상기 용매방출포트가 유체 연통되는 제1 모드; 및 상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트와 상기 고체상 추출칼럼 연결포트가 유체 연통되고, 상기 제2 용매 유입포트와 상기 시료이동루프 연결포트가 유체 연통되는 제2 모드를 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 시료유입밸브가 제1 모드이고 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때, 상기 시료저장루프에 상기 시료가 로딩될 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 시료유입밸브가 제2 모드이고, 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때, 상기 용매를 통해 상기 시료가 상기 고체상 추출칼럼에 주입될 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 시료유입밸브가 제1 모드이고, 상기 트랩밸브가 제2 모드일 때, 상기 용매를 통해 상기 고체상 추출칼럼에 주입된 시료가 상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼에 유입될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 시료유입밸브가 제2 모드이고 상기 트랩밸브가 제1 모드일 때 상기 고체상 추출칼럼으로 주입되는 시료의 방향과, 상기 시료유입밸브가 제1 모드이고 상기 트랩밸브가 제2 모드일 때 상기 고체상 추출칼럼에서 용출되는 시료의 방향은 상호 역방향인 것이 바람직하다.
- [0029] 또한, 상기 용매공급펌프는 5,000 psi 내지 20,000 psi의 압력으로 상기 용매를 공급하는 것이 바람직하다.
- [0030] 또한, 상기 용매공급펌프에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브가 설치될 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 역상 액체 크로마토그래피 칼럼은 질량 분석기(mass spectrometer)에 연결될 수 있다.

발명의 효과

- [0032] 본 발명에 따르면, T-형 용매분리부와 Z-형 용매유로가 형성된 트랩밸브의 특화된 연동을 통해 시료유입밸브 및 트랩밸브로 유입 및 유출되는 유체의 흐름을 변화시켜 시료의 주입방향과 시료의 용출방향을 상호 역방향으로 함으로써 분해능을 높일 수 있으며, 온-라인으로 시료의 탈염이 이루어지고 액체 크로마토그래피의 체류 시간에 대한 높은 반복재현성을 달성할 수 있는 가장 단순한 형태의 고효율 및 고재현성의 액체 크로마토그래피 장치를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료로딩모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료주입모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료분리모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 2a는 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료로딩모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 2b는 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료주입모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 2c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 시료분리모드에서의 밸브 구성도를 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치로부터 분리된 시료의 크로마토그램을 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체

적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치는, 도 1a에 도시된 바와 같이, 시료유입포트(101), 시료 방출포트(102), 시료저장루프(107)에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트(103) 및 제2 시료저장루프 연결포트(104), 용매유입포트(105), 및 용매유출포트(106)를 포함하는 시료유입밸브(100); 고체상 추출칼럼 (210) 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼(220)과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트(201), 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트(202), 제1 용매유입포트(203), 제2 용매유입포트(204), 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프(207)에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트(205), 및 용매방출포트(206)를 포함하는 트랩밸브 (200); 및 상기 시료유입밸브(100)로부터 유출된 용매의 흐름을 상기 트랩밸브(200)의 제1 용매유입포트(203) 및 제2 용매유입포트(204)로 분리하는 용매분리부;를 포함한다.
- [0036] 본 발명에 따른 액체 크로마토그래피 장치는 3개의 모드, 즉 시료로딩모드, 시료주입모드 및 시료분리모드를 포함하여 작동된다. 그리고, 각 모드에서의 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200)의 연결관계를 각각 도 1a 내지 도 1c에 도시하였다.
- [0037] 도 1a에 도시된 바와 같이, 본 발명에 따른 액체 크로마토그래피 장치는 2개의 밸브, 즉 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200)를 포함한다.
- [0038] 시료유입밸브(100)는 분석하고자 하는 시료가 유입되는 밸브로서, 6개의 포트(port)를 포함하며, 이는 시료유입 포트(101), 시료방출포트(102), 제1 시료저장루프 연결포트(103), 제2 시료저장루프 연결포트(104), 용매유입포트(105), 및 용매유출포트(106)이다.
- [0039] 시료로딩모드에서는, 분석 대상이 되는 시료가 시료유입포트(101)를 통하여 유입된다. 시료유입포트(101)로 유입된 시료는 소정 체적을 갖는 시료저장루프(107)와 연결되는데, 이와 같은 시료저장루프(106)를 통해 사용자가 시료의 농도가 너무 낮다고 판단하는 경우에 시료 주입을 복수회 반복함으로써 충분한 시료 농도를 얻는 것을 가능하게 한다.
- [0040] 상기 시료저장루프(107)는 $1\mu\text{l}$ 내지 $10\mu\text{l}$ 의 체적을 갖는 것이 바람직하며, 시료저장루프(107)의 체적이 $1\mu\text{l}$ 미만인 경우에는 시료의 취급이 어렵다는 문제점이 있고, $10\mu\text{l}$ 를 초과하는 경우에는 시료주입시간이 길어지는 문제점이 있어서 바람직하지 않다.
- [0041] 또한, 시료유입밸브(100)는 시료방출포트(102)를 포함하는데, 시료방출포트 (102)는 시료가 상기 시료저장루프 (107)에서 상술한 체적 범위 내로 수용될 수 있도록 여분의 시료를 방출하는 역할을 한다.
- [0042] 상술한 바와 같이 시료의 유입이 완료되면, 시료유입밸브(100)의 모드 전환 스위치(미도시)를 이용하여 제1 모드에서 제2 모드로 전환하여 포트의 연결 상태를 시료로딩모드(도 1a)에서 시료주입모드(도 1b)로 변경시킨다.
- [0043] 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피는 상기 시료유입밸브(100)의 용매유입포트(105)에 유체 연통되어 상기 시료유입밸브(100)에 용매를 공급하는 용매공급펌프(400)를 더 포함할 수 있다.
- [0044] 용매공급펌프(400)는 5,000 psi 내지 20,000 psi의 압력으로 용매를 공급하는 것이 바람직하는데, 용매의 공급 압력이 5,000 psi 미만인 경우에는 사용가능한 칼럼의 길이가 짧아져서 분리분해능이 저하되는 문제점이 있고, 20,000 psi를 초과하는 경우에는 밸브에서 용매가 누출될 수 있는 가능성이 있어서 바람직하지 않다.
- [0045] 용매공급펌프(400)에서 공급되는 용매는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합물일 수 있다. 이를 위해, 용매공급펌프(400)에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매가 일정비율로 섞여진 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브(미도시)가 설치되어 있다.
- [0046] 시료주입모드에서는, 용매공급펌프(400)를 통해 용매유입포트(105)로부터 제1 용매가 유입되며, 공급되는 제1 용매의 유입에 의해서 시료저장루프(107)에 머물던 시료는 용매유출포트(106)를 통하여 용매분리부(300)를 통과하게 된다.
- [0047] 특히, 본 발명은 용매분리부(300)를 통과한 시료 및 용매가 2개의 용매유입포트(203, 204)로 분리되어 트랩밸브 (200)로 유입된다는 데에 그 특징이 있다.
- [0048] 여기서, 용매분리부(300)는, 바람직하게는 T-형의 용매분리관을 포함하여, 유입되는 유체를 2개의 방향으로 분리하여 내보낸다.

- [0049] 트랩밸브(200)는 고체상 추출칼럼 연결포트(201), 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트(202), 제1 용매유입 포트(203), 제2 용매유입포트(204), 시료이동루프 연결포트(205) 및 용매방출포트(206)를 포함한다.
- [0050] 도 1b에 도시된 바와 같이, 시료주입모드에서의 트랩밸브의 연결관계는, 고체상 추출칼럼 연결포트(201)와 제1 용매유입포트(203)가 유체 연통되고, 시료이동루프 연결포트(205)와 용매방출포트(206)가 유체 연통되도록 구성 되어 있다.
- [0051] 따라서, 시료유입밸브(100)로부터 제1 용매와 함께 이송된 시료는 용매분리부(300)를 통과하고 제1 용매유입 포트(203)를 경유하여 고체상 추출칼럼 연결포트(201)를 통해서 고체상 추출 칼럼(210)으로 이송된다.
- [0052] 본 발명에서 트랩밸브(200)에는 도 1a 내지 도 1c에 도시된 바와 같이, 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z-형 용매유로가 형성될 수 있다. 즉, 일 예로서 도 1b를 살펴보면, 서로 유체 연통된 제1 용매유입포트(203)와 고체상 추출칼럼 연결포트(201), 시료이동루프(207) 및 서로 유체 연통된 시료이동루프 연결포트(205) 및 용매방출 포트(206)에 의해 Z-형 용매유로가 형성되어 있다.
- [0053] 고체상 추출칼럼(210)은 고체상 추출칼럼 연결포트(201)에 직접 결합된 칼럼으로서, 본 발명에 있어서, 고체상 추출칼럼(210)은 50 μ m 내지 500 μ m의 내경 및 1cm 내지 4cm의 길이를 갖는데, 이는 종래 통상적인 고체상 추출 칼럼에 비해서 매우 짧은 길이를 갖는 것으로, 본 발명에서는 약 20,000psi 정도의 초고압에서 구동됨에도 불구하고 고체상 추출칼럼의 길이가 상술한 바와 같이 매우 작기 때문에, 시료의 분리분해능을 극대화할 수 있게 된다. 또한, 후술하는 바와 같이, 시료주입방향과 시료용출방향이 상호 역방향인 관계로 더욱 향상된 시료 분리 분해능을 달성할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명에서는 고체상 추출 칼럼(210)으로 내부 인듀서 (internal inducer)의 스테인레스 스틸 라이너 (liner)를 사용하고, C18 등의 물질을 내부에 충전시킨 다음, 양 말단을 약 2 μ m 정도의 세공 크기를 갖는 스테 인레스 스틸 스크린으로 막아서 충전물의 유출을 차단함으로써, 높은 압력에 견딜 수 있는 견고한 고체상 추출 칼럼을 제작하였다.
- [0055] 한편, 제1 용매의 유압에 의해서 고체상 추출칼럼(210)에 유입되는 시료의 유속은 용매방출포트(206)에 의해서 조절될 수 있는데, 용매방출포트(206)는 0.5 μ l/분 내지 10 μ l/분의 유속으로 제1 용매를 방출함으로써 시료의 고체상 추출칼럼(210)으로의 유속을 조절한다. 또한, 용매방출포트(206)는 시료 중에 함유된 염 성분을 함께 방출함으로써, 효율적인 탈염 공정이 이루어질 수 있도록 한다.
- [0056] 이러한 과정에 의해서 상기 시료의 탈염이 진행되는 동안 고체상 추출칼럼 내에서의 유속은 1.8 μ l/분 내지 2.0 μ l/분으로 조절될 수 있다.
- [0057] 고체상 추출칼럼 내에서의 유속을 1.8 ~ 2.0 μ l/분으로 제한하는 이유는 탈염 효율의 증가, 생성되는 내부 압력 증가의 방지 및 고체상 추출칼럼에서 시료의 유실을 최소화를 보장하기 위해서이다.
- [0058] 상술한 과정까지는 시료가 시료유입포트(101)를 통하여 시료저장루프(107)에 소정량 채워진 다음, 제1 용매를 이용하여 용매분리부(300)를 거쳐 용매고체상 추출칼럼(210)에 주입되는 과정까지를 설명하였다.
- [0059] 다음 과정으로는, 고체상 추출칼럼(210)에 주입된 시료를 제2 용매를 사용하여 분리하는 과정이 수행되어야 하는 바, 이하 이에 대해서 설명하기로 한다. 특히, 본 발명에 따른 액체 크로마토그래피 장치는 후술하는 바와 같이 용매분리부(300)를 통해 시료의 주입방향과 시료의 용출방향을 상호 역방향으로 하여 시료의 분리 분해능 이 더욱 개선되는 효과가 있다.
- [0060] 도 1c에는 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200)가 시료분리모드로 전환된 상태의 모습을 도시하였다. 도 1c를 참조하면, 시료분리모드에서 시료유입밸브(100)의 연결관계는, 용매유입포트(105)와 용매유출포트(106)가 서로 유체 연통되어, 용매공급펌프(400)로부터의 용매가 이들을 거쳐 용매분리부(300)를 통과하도록 되어 있다. 이 를 위해, 시료유입밸브(100)의 모드전환 스위치를 이용하여 제2 모드(도 1b)에서 제1 모드(도 1c)로 각 포트의 연결관계를 전환시킨다.
- [0061] 시료분리모드에서의 용매는, 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매가 사용되며, 혼합용매의 비율을 달리하여 용매 기 울기를 통해 시료의 분리가 이루어진다.
- [0062] 또한, 트랩밸브(200)의 연결관계는, 도 1c를 참조하면, 제2 용매유입포트(204)와 시료이동루프 연결포트(205)가 유체 연통되고, 고체상 추출칼럼 연결포트(201)와 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트(202)가 유체 연통되 도록 되어 있다. 따라서, 용매분리부(300)를 통과한 혼합용매는 시료이동루프(207)를 경유하여 고체상 추출칼

럼(210)으로 이송된다. 이를 위해, 트랩밸브(200)의 모드전환 스위치를 이용하여 제1 모드(도 1b)에서 제2 모드(도 1c)로 각 포트의 연결관계를 전환시킨다.

[0063] 따라서, 본 발명에서는 별도의 밸브 및 용매공급펌프 없이도, 2개의 용매유입포트를 포함하는 트랩밸브(200)와 용매분리부(300)를 이용하여 시료의 주입방향과 시료의 용출방향이 상호 역방향이 되도록 할 수 있다.

[0064] 고체상 추출칼럼(210) 중에서의 시료 분리는 용매공급펌프(400)로부터 공급되는 혼합용매 중의 제1 용매 및 제2 용매 비율을 시간 경과에 따라 변화시켜가며 수행된다. 즉, 혼합용매 중의 제2 용매 비율이 증가할수록 고체상 추출칼럼(210)에 결합된 시료의 해리 정도가 증가하여 역상 액체 크로마토그래피 칼럼(220)으로 유입되고, 이후 시료의 분리가 수행된다.

[0065] 제1 용매 및 제2 용매로는 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위해서, 다양한 조합의 용매들이 선택될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 제1 용매로서 0.1%의 포름산 수용액이 사용될 수 있고, 상기 제2 용매로서 90%의 아세트니트릴 수용액이 사용될 수 있다. 즉, 이는 전체 용매 중 아세트니트릴의 함량이 증가할수록 고체상 추출 칼럼에 결합된 시료의 해리 정도가 증가하는 시스템을 채택한 것이라 할 수 있다.

[0066] 시료의 분리가 수행되는 역상 액체 크로마토그래피 칼럼(220)은 15 μ m 내지 150 μ m의 내경 및 10cm 내지 150cm의 길이를 갖는 것이 바람직하며, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼(220)은 질량 분석기(mass spectrometer)에 연결됨으로써, 후속 분석 공정이 수행될 수 있다.

[0067] 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치는, 도 2a에 도시된 바와 같이, 분석 대상이 되는 시료가 유입되며, 시료유입포트(101), 시료방출포트(102), 시료저장루프(107)에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트(103) 및 제2 시료저장루프 연결포트(104), 용매유입포트(105) 및 용매유출포트(106)를 포함하는 시료유입밸브(100); 고체상 추출칼럼(210) 및 역상 액체 크로마토그래피 칼럼(220)과 유체 연통되며, 고체상 추출칼럼 연결포트(201), 역상 액체 크로마토그래피 칼럼 연결포트(202), 제1 용매유입포트(203), 제2 용매유입포트(204), 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프(207)에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트(205), 및 용매방출포트(206)를 포함하는 트랩밸브(200); 및 공급되는 용매의 흐름을 상기 시료유입밸브(100) 및 상기 트랩밸브(200)로 분리하는 용매분리부(300);를 포함한다.

[0068] 이 때, 용매분리부(300)는 시료유입밸브(100)의 용매유입포트(105) 및 트랩밸브(200)의 제2 용매유입포트(204)와 유체 연통되어 있다. 또한, 시료유입밸브(100)의 용매유출포트(106)는 트랩밸브(200)의 제1 용매유입포트(203)에 유체 연통되어 있다.

[0069] 이 경우, 액체 크로마토그래피 장치는 용매분리부(300)의 유입부 측에 연통되어 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200) 중 적어도 하나의 밸브에 용매를 공급하는 용매공급펌프(400)를 더 포함할 수 있다.

[0070] 도 2a는 시료로딩모드에서의 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200)의 연결관계를 도시하고 있으며, 이 액체 크로마토그래피 장치는 용매공급펌프(400)로부터의 용매가 직접 용매분리부(300)로 유입되고, 용매분리부(300)는 용매의 흐름을 시료유입밸브(100)의 용매유입포트(105)와 트랩밸브(200)의 제2 용매유입포트(204)로 분리시킨다는 점에서 도 1a에 도시된 장치와 차이가 있을 뿐, 시료로딩모드, 시료주입모드 및 시료분리모드에서의 시료 및 용매의 흐름은 실질적으로 동일하다.

[0071] 즉, 도 2a 내지 도 2c에 도시된 트랩밸브(200)에서도 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z-형 용매유로가 형성된다.

[0072] 도 2b 및 도 2c는 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치에 있어서, 각각 시료주입모드 및 시료분리모드에서의 시료유입밸브(100) 및 트랩밸브(200)의 연결관계를 도시하고 있다.

[0073] 즉, 도 2a 내지 도 2c에 도시된 바와 같이, 본 발명의 다른 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치 역시 밸브를 더 구비하거나 용매공급펌프를 추가로 설치하지 않아도 2개의 용매유입포트를 포함하는 트랩밸브(200)와 용매분리부(300)를 이용하여 시료의 주입방향과 시료의 용출방향이 상호 역방향이 되도록 할 수 있다.

[0074] 실시예

[0075] 시료의 전처리

[0076] 분석 시료로서 베이커스 효모 (bakers yeast)로부터 분리한 이놀라아제 (enolase) (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA로부터 구입)를 사용하였으며, 시료의 전처리는 서열급 변형 돼지 트립신 (Promega, Madison, WI, USA로부터 구입)을 사용하여 수행하였다. 시료의 전처리는 하기 과정에 따라서 수행하였다.

[0077] 이놀라아제를 100mM의 NH_4HCO_3 완충용액 중에 용해시킨 다음, 90℃에서 10분 동안 열변성시키고, 실온으로 냉각시킨 후, 메탄올을 가하고, 기질 대 효소의 중량비가 50:1이 되도록 트립신을 가하였다. 트립신에 의한 가수분해는 37℃에서 12시간 동안 수행되었다.

[0078] 한편, 더욱 복잡한 프로테옴 시료에 대한 분석을 수행하기 위해서, 효모 전용해액 (whole lysate)의 트립신 분해 펩타이드를 사용하였다. 효모 프로테옴은 *S.cerevisiae* 반수체 균주 (haploid strains)인 Y2805 (*MATa pep::his3 prb1-D1.6R can1 his1-200 ura3-52*) 및 AF-2 (*HMLa or HMRA ho ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 ssd1*)를 사용하였다 (Kim, M. -S., Choie, W. -S., Shin, Y. S., Yu, M. H., Lee, S. -W., *Bull. Korean Chem. Soc.* 2004, 25, 1833-1839.). 이 경우, 단백질을 100mM NH_4HCO_3 완충용액 중에 용해시킨 다음, 트립신을 가하고 37℃에서 20시간 동안 가수분해시켰다. 결과물은 SpeedVac system (SPD1010; ThermoSavant, Holbrook, NY, USA)을 사용하여 완전히 건조시킨 다음, 다음 실험을 수행할 때까지 -20℃에서 보관하였다.

[0079] 기기

[0080] 제1 용매로는 0.1%의 포름산 수용액 (Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입)을 사용하였으며, 제2 용매로는 0.1% 포름산이 포함된 100% 아세토니트릴(J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA로부터 구입))을 사용하였다.

[0081] 모세관 칼럼 (75 μm ID×360 μm OD×80 cm length), 즉 역상 액체 크로마토그래피 칼럼은 융합-실리카 모세관을 C18-결합 입자들로 슬러리 패키징함으로써 제작하였다(Shen, Y., Moore, R. J., Zhao, R., Blonder, J., *et al.*, *Anal. Chem.* 2003, 75, 3596-3605; Shen, Y., Tolic N., Masselon, C., Pasa-Tolic L. *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, 76, 144-154; Shen, Y., Smith, R. D., Unger K. K., Kumar, D., Lubda, D., *Anal. Chem.* 2005, 77, 6692-6701).

[0082] 고체상 추출 칼럼은 VICI (Houston, TX, USA)로부터 구입한 내부 리듀서를 사용하여 제작하였다. 이는 내부 리듀서 (1/16" 내지 1/32") 내에 위치한 1cm 라이너 (250 μm ID)를 10,000psi의 압력에서 C18 물질로 충전시킴으로써 제작되었다. 충전 단계가 완료된 이후에는, 칼럼에 대해서 10,000psi의 압력을 유지하면서 5분 동안 초음파 처리하고, 칼럼 사용 이전에 압력을 밤새도록 낮추어 주었는데, 이는 충전된 C18 물질들이 분산되는 것을 방지하기 위한 것이다. 또한, 실제 실험에 사용하기 이전에 라이너의 양 말단에 스테인레스 스틸 스크린(2 μm 세공)을 부착시켰다.

[0083] 한편, 역상 액체 크로마토그래피 칼럼과 연결되는 질량 분석기(mass spectrometer)로는 나노전자분무 이온화 인터페이스 (nanoelectrospray ionization interface)를 구비한 7-테슬라 후리에 변환 이온 사이클로트론 공명 질량 분석기 (7-tesla Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) (FTICR, LTQ-FT, ThermoFinnigan)를 사용하였다.

[0084] 분석 결과의 평가

[0085] 상기 전처리 과정에 의해서 제조된 이놀라아제 트립신 분해산물에 대해서 본 발명의 일 실시예에 따른 액체 크로마토그래피 장치를 사용한 분석을 수행하였다.

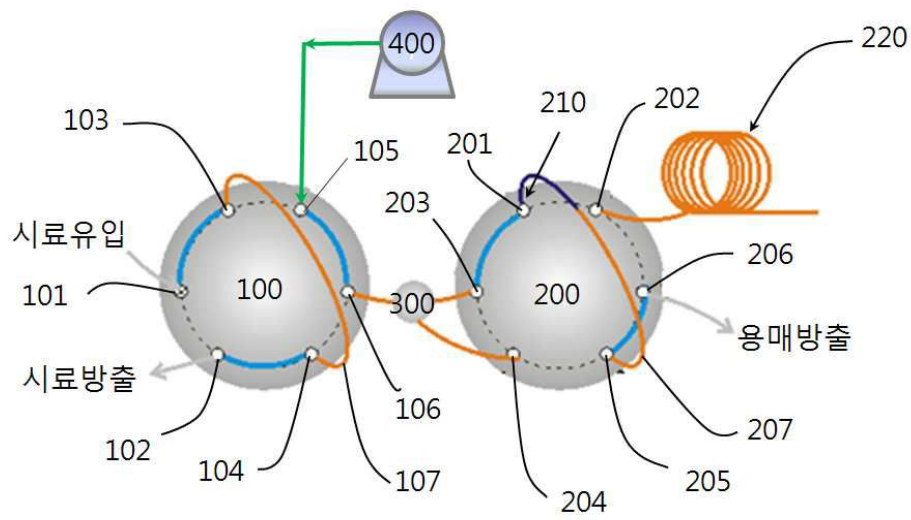
[0086] 본 발명에 따른 액체 크로마토그래피 장치의 재현성을 입증하기 위해 동일한 조건 하에 총 6번의 분석을 수행하였으며, 펩타이드 시료를 고체상 추출칼럼으로 보낸 후, 이를 역상 크로마토그래피 방법에 의해 분리하고, 이어서 질량분석기를 통해 얻은 분리된 시료의 크로마토그램을 도 3에 도시하였다.

[0087] 총 120분의 용출시간에 대해 각 실험별 표준편차가 0.1% 이내임이 확인되었으며, 이를 통해 본 발명에 따른 액체 크로마토그래피 장치는 우수한 실험 재현성을 가지고 있음을 알 수 있다.

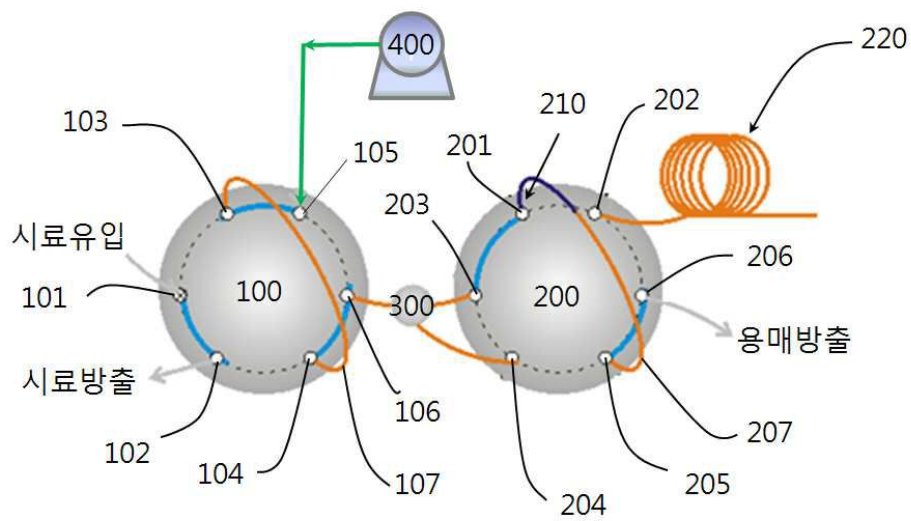
[0088] 본 발명의 단순한 변형 또는 변경은 모두 이 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

도면

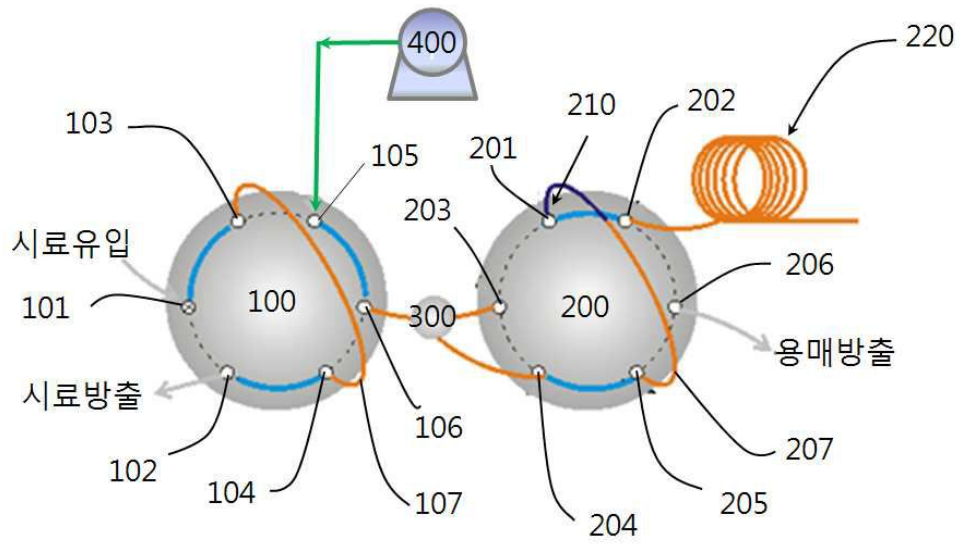
도면1a



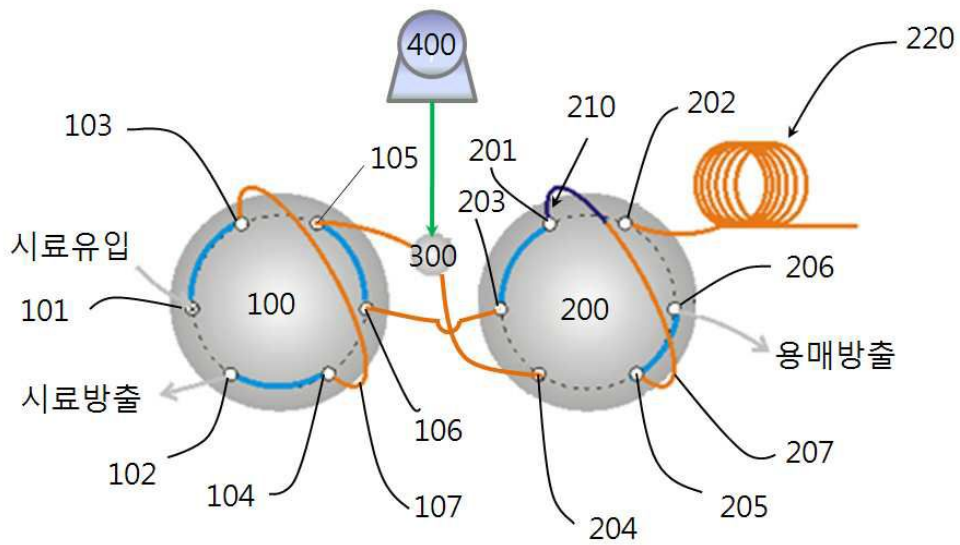
도면1b



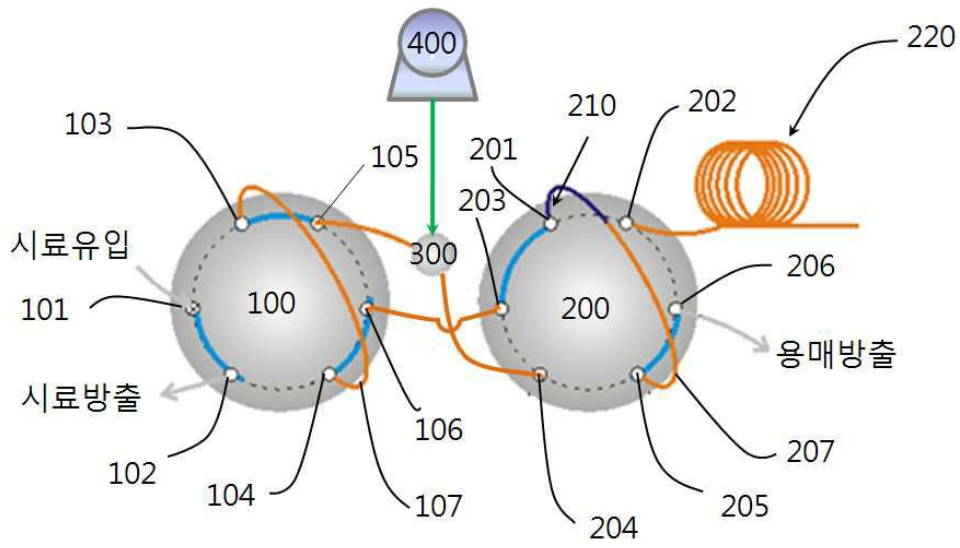
도면1c



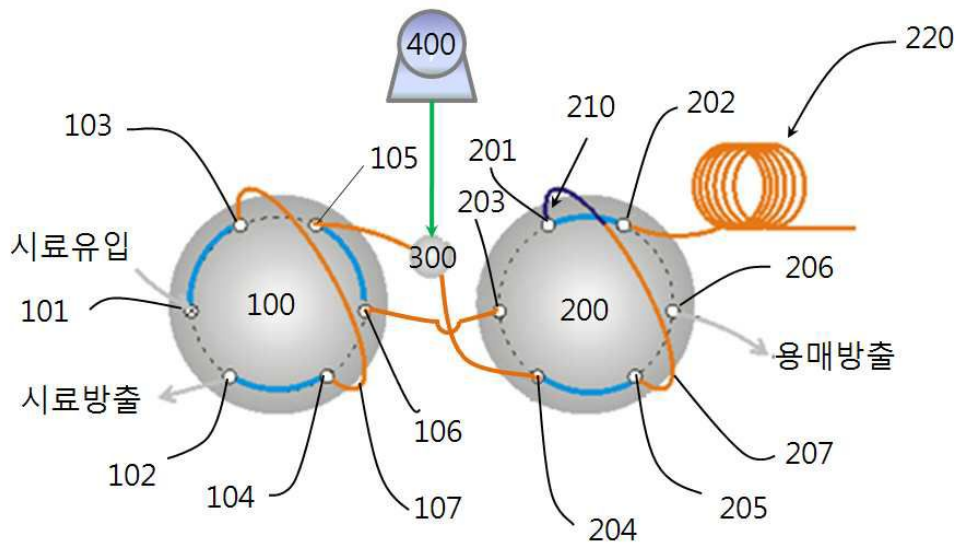
도면2a



도면2b



도면2c



도면3

