(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2011 년 12 월 29 일 (29.12.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/162575 A2

(51) 국제특허분류:
G01N 30/20 (2006.01) *G01N 30/24* (2006.01)
G01N 30/22 (2006.01) *G01N 30/02* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2011/004637

(22) 국제출원일: 2011 년 6 월 24 일 (24.06.2011)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2010-0060601 2010 년 6 월 25 일 (25.06.2010) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5 가 1, 136-701 Seoul (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이상원 (LEE, Sang Won)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 래미안아파트 106 동 503 호, 136-071 Seoul (KR). **형석원 (HYUNG, Seok-Won)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 안암동 5 가 고려대학교 자연계캠퍼스 아산이학관 224 호, 136-713 Seoul (KR). **이정화 (LEE, Jung-Hwa)** [KR/KR]; 경기도 부천시 원미구 중 1 동 무지개마을 아파트 1201 동 1304 호, 420-723 Gyeonggi-do (KR). **김경철 (KIM, Kyong-Chul)** [KR/KR]; 경기도 광명시 광명 1 동 68-26 삼성파크빌 202 호, 423-801 Gyeonggi-do (KR). **문동기 (MUN, Dong-Gi)** [KR/KR]; 서울특별시 성북구 돈암 2 동 일신건영휴먼빌아파트 102 동 1604 호, 136-796 Seoul (KR).

(74) 대리인: **특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM)**; 서울특별시 서초구 양재동 4-4 한마음빌딩 4 층, 137-130 Seoul (KR).

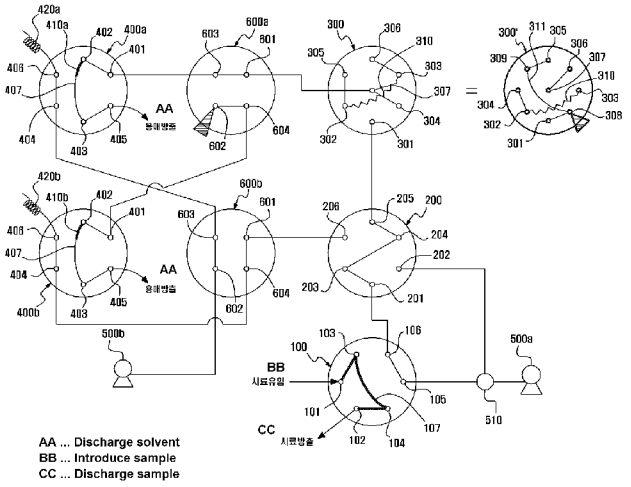
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: AUTOMATED DUAL ONLINE MULTI-FUNCTION LIQUID CHROMATOGRAPHY DEVICE

(54) **발명의 명칭** : 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치

[Fig. 1]



(57) **Abstract**: The present invention relates to an automated dual online multi-function liquid chromatography device, and comprises: a sample introduction valve for a sample being subject to the analysis to be loaded; a first trap valve that fluid-communicates with a first solid-phase extraction column and a first reversed-phase liquid chromatography column; a second trap valve that fluid-communicates with a second solid-phase extraction column and a second reversed-phrase liquid chromatography column; a first isolation valve and a second isolation valve for selectively discharging the introduced fluid to each of the first trap valve or the second trap valve; a multi-function selector valve, which is placed on a fluid passage from the sample introduction valve to the first and the second trap valves, and is connected with a sample isolation column; and a connection valve that selectively supplies the fluid discharged from the sample introduction valve to the multi-function selector valve, the first trap valve, or the second trap valve, and using the automated dual online multi-function liquid chromatography device of the present invention enables implementation of 1-dimension isolation function capable of desalting process and sample concentration, 2-dimension isolation function capable of enhancing the efficiency of desalting process and sample concentration by passing through the sample isolation column, and online peptizing function, and at the

[다음 쪽 계속]

WO 2011/162575 A2

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

same time can increase the speed of an experiment by minimizing dead time, which is when experiment has to be paused while the columns are being balanced in between the experiments, and is repeated for every experiment.

(57) 요약서: 본 발명은 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 관한 것으로서, 분석 대상이 되는 시료가 로딩되는 시료유입밸브; 제 1 고체상 추출칼럼 및 제 1 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제 1 트랩밸브; 제 2 고체상 추출칼럼 및 제 2 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제 2 트랩밸브; 유입되는 유체를 상기 제 1 트랩밸브 또는 상기 제 2 트랩밸브로 선택적으로 각각 배출시키는 제 1 분리밸브 및 제 2 분리밸브; 상기 시료유입밸브에서 상기 제 1, 제 2 트랩밸브로 향하는 유로에 위치하며, 시료분리칼럼이 연결되는 다기능 선택밸브; 및 상기 시료유입밸브로부터 유출되는 유체를 상기 다기능 선택밸브, 상기 제 1 트랩밸브, 또는 상기 제 2 트랩밸브로 선택적으로 공급하는 연결밸브;를 포함하며, 본 발명에 따른 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치를 이용하면 탈염과정 및 시료농축이 가능한 1 차원 분리기능 및 시료분리칼럼을 통과시켜 탈염과정 및 시료농축의 효율을 높일 수 있는 2 차원 분리기능과, 온라인 소화기능을 수행할 수 있으며, 이와 함께 매회 반복되는 실험 사이에 소요되는 칼럼 평형화 시간 동안 실험을 멈추어야 하는 휴지 시간(dead time)을 최소화하여 실험속도를 증가시킬 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치

기술분야

[1] 본 발명은 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 온라인 시료 탈염 과정과 시료 농축, 온라인 소화기능 및 인산화 펩티드 추출기능이 가능하고, 매회 반복되는 실험 사이에 소요되는 칼럼 평형화 시간 동안 실험을 멈추어야 하는 휴지 시간(dead time)을 최소화하여 실험속도를 증가시키며, 시료를 빠른 속도로 주입할 수 있고, 나아가 액체 크로마토그래피의 체류 시간에 대한 반복재현성이 매우 높은 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 관한 것이다.

배경기술

[2] 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 단백질들을 동정하는 것을 가능하게 한다.

[3] 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 바텀-업 방법 등은 질량 분석기를 사용한 분석 이전에 단백질을 가수분해하여 펩티드로 분해하는데, 이러한 가수분해는 생체 시료들의 용해도를 증가시키며 질량 분석기 중에서 용이하게 이온화 및 검출이 가능한 펩티드 절편들을 생성한다.

[4] 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 펩티드 절편들이 생성된다. 따라서, 이러한 시료 복잡성을 해결하기 위한 방편으로서, 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.).

[5] 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.

[6] 한편, 종래의 역상 액체크로마토그래피 장치는 고체상 추출칼럼을 채용하여 시료를 탈염시키고 농축시키는 1차원 분리기능만을 가지거나, 강양이온교환 크로마토그래피장치와 역상 액체크로마토그래피를 온라인으로 연결하여 2차원 분리기능을 수행하는 2차원 역상 액체크로마토그래피 장치의 경우에도 상호 간섭현상 등에 의해서 정확한 분석을 수행하기가 곤란한 문제점이 있었다. 또한, 이러한 2차원 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서는 단백질을 펩티드 상태로 소화시켜주는 온라인 소화(On-line digestion) 기능이나 인산화된 펩티드만을 선택적으로 추출하는 기능을 수행할 수 없었다. 나아가, 긴 길이 및 작은 내부 직경을 갖는 모세관 칼럼을 소수성 매질로 채우는 경우에는 칼럼 평형화(또는 재생)을 위해서 장시간이 소요된다는 문제점이 있었다. 예를 들어, 1m 길이 및 75㎛의 내경을 갖는 칼럼을 재사용하기 위해서는 평형화에 적어도 2시간 이상이 소요된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 탈염과정 및 시료농축이 가능한 1차원 분리기능, 시료분리칼럼을 통과시켜 탈염과정 및 시료농축의 효율을 높일 수 있는 2차원 분리기능, 온라인 소화기능 및 인산화된 펩티드만을 추출하는 기능을 수행함과 동시에, 매회 반복되는 실험 사이에 소요되는 칼럼 평형화 시간 동안 실험을 멈추어야 하는 휴지 시간(dead time)을 최소화하여 실험속도를 증가시키고, 시료를 빠른 속도로 주입할 수 있으며, 나아가 액체 크로마토그래피의 체류 시간에 대한 반복재현성이 매우 높은 자동화 이중 온라인 액체 크로마토그래피 장치를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[8] 본 발명은 상술한 과제를 달성하기 위하여,

[9] 분석 대상이 되는 시료가 로딩되는 시료유입밸브;

[10] 제1 고체상 추출칼럼 및 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제1 트랩밸브;

[11] 제2 고체상 추출칼럼 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제2 트랩밸브;

[12] 유입되는 유체를 상기 제1 트랩밸브 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 각각 배출시키는 제1 분리밸브 및 제2 분리밸브;

[13] 상기 시료유입밸브에서 상기 제1, 제2 트랩밸브로 향하는 유로에 위치하며, 시료분리칼럼이 연결되는 다기능 선택밸브; 및

[14] 상기 시료유입밸브로부터 유출되는 유체를 상기 다기능 선택밸브, 상기 제1 트랩밸브, 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 공급하는 연결밸브;를 포함하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치를 제공한다.

[15] 여기서, 상기 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 용매를 공급하는 제1 용매공급펌프 및 제2 용매공급펌프를 더 포함할 수 있다.

[16] 또한, 상기 제1 용매공급펌프는 시료유입밸브 또는 상기 연결밸브에 유체연통되어 있고, 상기 제2 용매공급펌프는 상기 제2 분리밸브에 유체연통되어 있는 것이 바람직하다.

[17] 또한, 상기 제1 용매공급펌프는 T형 용매분리관을 통해 상기 시료유입밸브 또는 상기 연결밸브에 선택적으로 용매를 공급하는 것이 바람직하다.

[18] 또한, 상기 제1 용매공급펌프 및 상기 제2 용매공급펌프 중 하나 이상에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브가 설치된 것이 바람직하다.

[19] 또한, 상기 시료유입밸브는, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및 제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 것이 바람직하다.

[20] 또한, 상기 시료유입밸브는, 상기 시료유입포트와 상기 제1 시료저장루프 연결포트가 유체연통되고, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 시료방출포트가 유체연통되는 제1 모드; 및 상기 제1 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유출포트가 유체연통되며, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유입포트가 유체연통되는 제2 모드;를 포함할 수 있다.

[21] 또한, 상기 연결밸브는, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 제1 연결포트, 제2 연결포트, 제1 유출포트 및 제2 유출포트를 포함할 수 있다.

[22] 또한, 상기 연결밸브는, 상기 제1 유입포트, 상기 제1 연결포트, 상기 제2 연결포트, 상기 제1 유출포트가 순차적으로 유체연통되는 제1 모드; 및 상기 제2 유입포트, 상기 제2 연결포트, 상기 제1 연결포트, 상기 제2 유출포트가 순차적으로 유체연통되는 제2 모드;를 포함할 수 있다.

[23] 또한, 상기 연결밸브에는 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z형 유로가 형성되는 것이 바람직하다.

[24] 또한, 상기 다기능 선택밸브는, 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체를 유입하여 상기 트랩밸브로 배출시키는 유체통과모드; 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 시료분리칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 칼럼통과모드; 및 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체의 내부 유입을 방지하는 유체폐쇄모드;를 포함할 수 있다.

[25] 또한, 상기 다기능 선택밸브는, 유입포트, 유출포트, 상기 시료분리칼럼의 양단과 각각 연결되는 제1 시료분리칼럼 연결포트 및 제2 시료분리칼럼

연결포트, 상기 모드들을 구현하도록 다른 포트들과 선택적으로 유체연통되는 복수의 선택포트를 포함할 수 있다.

[26] 또한, 상기 유체통과모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체연통되고, 상기 칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 시료분리칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 시료분리칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되며, 상기 유체폐쇄모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체단절되는 것이 바람직하다.

[27] 또한, 상기 다기능 선택밸브에는 이산화티타늄칼럼이 더 연결되고,

[28] 상기 다기능 선택밸브는, 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체를 유입하여 상기 트랩밸브로 배출시키는 유체통과모드; 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 시료분리칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 칼럼통과모드; 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체의 내부 유입을 방지하는 유체폐쇄모드; 및 상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 이산화티타늄칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 이산화티타늄칼럼통과모드;를 포함할 수 있다.

[29] 또한, 상기 다기능 선택밸브는, 유입포트, 유출포트, 상기 시료분리칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 시료분리칼럼 연결포트 및 제2 시료분리칼럼 연결포트, 상기 이산화티타늄칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트 및 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트, 상기 모드들을 구현하도록 다른 포트들과 선택적으로 유체연통되는 복수의 선택포트를 포함할 수 있다.

[30] 또한, 상기 유체통과모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체연통되고, 상기 칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 시료분리칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 시료분리칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되고, 상기 유체폐쇄모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체단절되고, 상기 이산화티타늄칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되는 것이 바람직하다.

[31] 또한, 상기 제1 트랩밸브는, 상기 제1 고체상 추출칼럼과 유체연통되는 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 방출포트를 포함하고, 상기 제2 트랩밸브는, 상기 제2 고체상 추출칼럼과 유체연통되는 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 방출포트를 포함할 수 있다.

[32] 또한, 상기 제1 트랩밸브 및 상기 제2 트랩밸브 각각은, 상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 유입포트, 상기 시료이동루프 연결포트와 상기 방출포트가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드; 및 상기 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트와 상기 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제2 유입포트와 상기 시료이동루프 연결포트가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드;를 포함할 수 있다.

[33] 또한, 상기 제1 분리밸브 및 제2 분리밸브 각각은, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 제1 유출포트 및 제2 유출포트를 포함할 수 있다.

[34] 또한, 상기 제1 분리밸브 및 상기 제2 분리밸브 각각은, 상기 제1 유입포트와 상기 제1 유출포트, 상기 제2 유입포트와 상기 제2 유출포트가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드; 및 상기 제1 유입포트와 상기 제2 유출포트, 상기 제2 유입포트와 상기 제1 유출포트가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드;를 포함할 수 있다.

[35] 또한, 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 상기 시료가 분석되는 동안 상기 제2 고체상 추출칼럼 및 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 평형화가 이루어지는 것이 바람직하다.

[36] 또한, 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 상기 시료가 분석되는 동안 상기 제1 고체상 추출칼럼 및 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 평형화가 이루어지는 것이 바람직하다.

[37] 또한, 상기 제1 고체상 추출칼럼에서, 유입되는 시료의 흐름방향과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 향해 용출되는 시료의 흐름방향은 서로 반대이고, 상기 제2 고체상 추출칼럼에서, 유입되는 시료의 흐름방향과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 향해 용출되는 시료의 흐름방향은 서로 반대인 것이 바람직하다.

발명의 효과

[38] 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치를 이용하면, 탈염과정 및 시료농축이 가능한 1차원 분리기능 및 시료분리칼럼을 이용한 1차원 분리와 역상 2차원 분리를 연결하여 분리 효율을 높일 수 있는 2차원 분리기능 및 용매에 고압을 생성하여 단백질을 펩티드 상태로 소화시켜주는 온라인 소화기능을 수행할 수 있다. 이와 더불어, 이산화티타늄칼럼을 이용하여 인산화된 펩티드만을 선택적으로 추출할 수 있다. 또한, 복수개의 칼럼과 복수개의 펌프를 이용함으로써 매회 반복되는 실험 사이에 소요되는 칼럼 평형화 시간 동안 실험을 멈추어야 하는 휴지 시간(dead time)을 최소화하여 실험속도를 증가시킬 수 있다. 즉, 제1 용매공급펌프의 용매가 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼으로 흐를 경우 제2 용매공급펌프의 용매는 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼으로 흐르면서, 한쪽 칼럼에서 시료가 분석되는 동안 다른쪽 칼럼은 용매가 흐르면서 시료가 이동했던 경로를 씻어주고 칼럼 상태를 평형화시켜주는 역할을 하므로, 휴지시간을 최소화하고

시료분석효율을 높일 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[39] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 시료로딩단계에서의 각 밸브의 구성도이다.

[40] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 온라인 소화기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[41] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 1차원 분리기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[42] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 2차원 분리기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[43] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 인산화펩티드 추출기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[44] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서, 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 시료분석이 이루어지는 동안 제2 고체상 추출칼럼 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 평형화가 이루어지는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[45] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[46] 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치는 도 1에 도시된 바와 같이, 분석 대상이 되는 시료가 로딩되는 시료유입밸브(100); 제1 고체상 추출칼럼(410a) 및 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)과 유체연통되는, 제1 트랩밸브(400a); 제2 고체상 추출칼럼(410b) 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼(420b)과 유체연통되는, 제2 트랩밸브(400b); 유입되는 유체를 상기 제1 트랩밸브 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 각각 배출시키는 제1 분리밸브(600a) 및 제2 분리밸브(600b); 상기 시료유입밸브에서 상기 제1, 제2 트랩밸브로 향하는 유로에 위치하며, 시료분리칼럼(310)이 연결되는 다기능 선택밸브(300); 및 상기 시료유입밸브로부터 유출되는 유체를 상기 다기능 선택밸브, 상기 제1 트랩밸브, 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 공급하는 연결밸브(200);를

포함한다.

[47] 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치는 상술한 각 밸브들의 모드(또는 포지션)를 변경시킴으로써, 즉 밸브의 단순 조작만으로 다양한 기능을 수행함과 동시에 한쪽 칼럼에서 시료가 분석되는 동안 다른쪽 칼럼은 용매가 흐르면서 시료가 이동했던 경로를 씻어주고 칼럼 상태를 평형화시켜 휴지시간을 최소화할 수 있다. 여기서, 시료유입밸브(100), 연결밸브(200), 제1 및 제2 분리밸브(600a, 600b), 제1 및 제2 트랩밸브(400a, 400b)는 2개의 모드를 포함할 수 있고, 액체크로마토그래피 장치의 다양한 기능을 수행하는데 이용되는 다기능 선택밸브(300)는 3개 또는 4개의 모드를 포함할 수 있다. 이하에서는 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 시료의 분석이 이루어지는 과정과, 시료 분석 과정에서 동시에 칼럼의 평형화가 진행되는 과정을 예를 들어 설명하기로 한다.

[48] 도 1은 시료로딩단계에서 자동화 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 밸브 구성도를 도시한 도면이다.

[49] 시료유입밸브(100)는 분석하고자 하는 시료를 유입하여 시료를 로딩하는 밸브로서, 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 포함할 수 있다.

[50] 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치는 도 1에 도시된 바와 같이 2개의 용매공급펌프(500a, 500b)를 이용하여 2개의 역상 액체크로마토그래피칼럼 중 하나의 칼럼에서 시료의 분석이 이루어지는 동안 다른 하나의 칼럼에서는 칼럼의 평형화를 가능하게 한다. 또한, 이와 같은 자동화 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치에서는 다기능 선택밸브(300)를 이용하여 유체의 이동경로를 변경시킴으로써, 탈염과정 및 시료농축이 가능한 1차원 분리기능, 시료분리칼럼을 이용한 1차원 분리와 역상 2차원 분리를 연결하여 분리 효율을 높일 수 있는 2차원 분리기능, 용매에 고압을 생성하여 단백질을 펩티드 상태로 소화시켜주는 온라인 소화기능 이외에도 이산화티타늄칼럼을 이용하여 인산화된 펩티드만을 선택적으로 추출하는 기능을 수행할 수 있다.

[51] 도 1에 도시된 시료유입밸브의 상태는 시료가 로딩되는 단계를 나타낸 것으로서, 시료유입포트(101)와 제1 시료저장루프 연결포트(103), 시료방출포트(102)와 제2 시료저장루프 연결포트(104)가 각각 서로 유체연통되어 있어서 시료는 시료유입포트(101)를 통하여 시료저장루프(107)에 유입될 수 있다. 이와 같은 시료저장루프(107)를 통해 사용자가 시료의 농도가 너무 낮다고 판단하는 경우에는 시료 주입을 복수회 반복함으로써 충분한 시료 농도를 얻는 것이 가능하게 된다.

[52] 시료저장루프(107)는 1㎕ 내지 10㎕의 체적을 갖는 것이 바람직하며, 시료저장루프(107)의 체적이 1㎕ 미만인 경우에는 시료의 취급이 어렵다는

문제점이 있고, 10㎕를 초과하는 경우에는 시료주입시간이 길어지는 문제점이 있어서 바람직하지 않다.

[53] 또한, 시료유입밸브(100)는 시료방출포트(102)를 포함하는데, 시료방출포트(102)는 시료가 시료저장루프(107)에서 상술한 체적 범위 내로 수용될 수 있도록 여분의 시료를 방출하는 역할을 한다.

[54] 상술한 바와 같이 시료의 유입이 완료되면, 시료유입밸브(100)의 모드 전환 스위치(미도시)를 이용하여 시료유입밸브의 연결상태를 도 1에 도시된 제1 모드에서 도 2에 도시된 제2 모드로 변환시킨다.

[55] 시료유입밸브(100)의 제2 모드에서는 제1 시료저장루프 연결포트(103)와 용매유출포트(106)가 유체 연통되며, 제2 시료저장루프 연결포트(104)와 용매유입포트(105)가 유체연통되도록 구성된다.

[56] 한편, 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치는 용매를 공급하는 제1 용매공급펌프(500a) 및 제2 용매공급펌프(500b)를 더 포함할 수 있다. 도 1에 도시된 바와 같이, 제1 용매공급펌프(500a)는 시료유입밸브(100) 또는 연결밸브(200)에 유체연통될 수 있고, 제2 용매공급펌프(500b)는 제2 분리밸브(600b)에 유체연통될 수 있다.

[57] 이들 각 용매공급펌프(500a, 500b)는 5,000 psi 내지 20,000 psi의 압력으로 용매를 공급하는 것이 바람직한데, 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.

[58] 용매공급펌프(500a, 500b)에서 공급되는 용매는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합물일 수 있다. 이를 위해, 용매공급펌프(500a, 500b)에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매가 일정비율로 섞여진 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브(미도시)가 설치될 수 있다.

[59] 또한, 제1 용매공급펌프(500a)에는 시료유입밸브(100) 또는 연결밸브(200)에 용매를 선택적으로 공급하는 T형 용매분리관(510)이 연결될 수 있다.

[60] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 온라인 소화기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[61] 제1 용매공급펌프(500a)를 통해 용매유입포트로부터 제1 용매가 시료유입밸브(100)로 유입되며, 공급되는 제1 용매의 유압에 의해서 시료저장루프(107)에 머물던 시료는 용매유출포트(106)를 통해 배출되고, 연결밸브(200)에 이르게 된다.

[62] 연결밸브(200)는 제1 유입포트(201), 제2 유입포트(202), 제1 연결포트(203), 제2 연결포트(204), 제1 유출포트(205) 및 제2 유출포트(206)를 포함할 수 있고, 연결밸브(200)의 제1 유입포트(201)는 시료유입밸브(100)의 용매유출포트(106)와 유체연통되어 있다.

[63] 온라인 소화기능을 수행하는 과정에서 연결밸브(200)는 제1 유입포트(201), 제1 연결포트(203), 제2 연결포트(204), 제1 유출포트(205)를 순차적으로 유체연통된 모드를 가진다. 따라서, 용매공급펌프로부터 유입된 제1 용매는 시료와 함께 연결밸브(200)의 제1 유입포트(201), 제1 연결포트(203), 제2 연결포트(204), 제1 유출포트(205)를 거치면서 연결밸브를 통과하게 된다. 이 때, 도 2에 도시된 바와 같이 연결밸브에는 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z형 유로가 형성되게 된다.

[64] 연결밸브(200)를 통과한 제1 용매는 연결밸브(200)의 제1 유출포트(205)와 유체연통된 다기능 선택밸브(300)의 유입포트(301)를 통해 다기능 선택밸브에 이르게 된다.

[65] 다기능 선택밸브(300)는 도 2에 도시된 바와 같이 유입포트(301), 유출포트(307), 시료분리칼럼(310)의 양단이 각각 연결되는 제1 시료분리칼럼 연결포트(302), 제2 시료분리칼럼 연결포트(303), 이들 포트들과 선택적으로 연결가능하게 구성된 제1 선택포트(304), 제2 선택포트(305), 및 제3 선택포트(306)를 포함하여 구성될 수 있다. 또한, 인산화펩티드 추출기능을 위해 이산화티타늄칼럼(311)이 더 연결될 수 있는데, 이 때 다기능 선택밸브(300')는 이산화티타늄칼럼(311)의 양단에 연결되는 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트(308) 및 제2 이산화티타늄칼럼연결포트(309)를 추가로 포함할 수 있다.

[66] 다기능 선택밸브(300)는 액체크로마토그래피 장치에서 시료가 로딩되는 시료유입밸브에서 로딩된 시료가 분석되는 역상 액체크로마토그래피 칼럼이 연결되는 트랩밸브를 향하는 유로에 위치할 수 있다.

[67] 본 발명에 따른 다기능 선택밸브(300)는 각 포드의 연결상태를 변경함으로써 3가지 모드를 구현할 수 있고, 이산화티타늄칼럼(311)이 연결된 경우라면 4가지 모드를 구현할 수 있다.

[68] 도 2에 도시된 다기능 선택밸브(300)는 그 중 첫번째인 온라인 소화기능을 수행하는 유체폐쇄모드를 나타낸다. 즉, 유체폐쇄모드에서는 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 다기능 선택밸브(300) 내부로의 유입이 방지된다. 도 2에 도시된 바와 같이, 이 모드에서는 유입포트(301)와 유출포트(307)은 서로 유체단절되어 있다. 이를 위해 제2 선택포트(305)와 제1 시료분리칼럼 연결포트(302), 유출포트(307)와 제1 선택포트(304), 제2 시료분리칼럼 연결포트(303)와 제3 선택포트(306)가 각각 서로 유체연통될 수 있다. 따라서, 유입되는 제1 용매는 다기능 선택밸브(300)를 통과하지 못하고 이에 따라 공급되는 제1 용매의 압력은 점점 증가하게 된다. 이와 같이, 용매의 이송과정에서 용매의 흐름을 막아 높은 압력을 발생시킴으로써 단백질을 펩티드 상태로 소화시켜주는 온라인 소화기능이 수행되게 된다. 이 경우, 온라인 소화기능은 용매의 압력이 증가될수록 그 효율이 향상되므로, 제1 용매의 압력을 밸브의 최대허용압력까지 높여주는 것이 좋다.

[69] 한편, 이산화티타늄칼럼이 연결된 9포트의 다기능 선택밸브(300')에서는 제1

이산화티타늄칼럼 연결포트(308)를 폐쇄시킴으로써 유체폐쇄모드를 구현할 수 있다.

[70] 온라인 소화기능이 수행된 이후, 시료의 탈염 및 농축을 위한 1차원 분리과정이 수행될 수 있다. 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 1차원 분리기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[71] 도 3에 도시된 바와 같이, 1차원 분리기능을 수행하기 위해서 다기능 선택밸브(300)를 유체통과모드, 즉 유입포트(301)와 유출포트(307)를 직접 서로 유체연통시키도록 모드를 변경시킨다. 이 때, 7포트의 다기능 선택밸브(300)에서는 제2 선택포트(305)와 제3 선택포트(306), 제2 시료분리칼럼 연결포트(303)와 제1 선택포트(304)가 각각 서로 유체연통될 수 있다. 또한, 9포트의 다기능 선택밸브(300')에서는 제1 선택포트(304)와 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트(309), 제2 선택포트(305)와 제2 선택포트(306)가 각각 서로 유체연통될 수 있다. 이와 같은 포트들의 연결관계는 일 실시예에 불과하며, 원하는 모드를 위해 다양한 포트들의 연결관계를 가질 수 있음은 당업자에게 자명하다.

[72] 이와 같은 포트의 연결관계에 따라 유입포트로부터 유입된 용매가 시료분리칼럼(310)을 통과하지 않고 유출포트를 통해 제1 트랩밸브(400)쪽으로 배출될 수 있다.

[73] 다기능 선택밸브를 통과한 제1 용매는 제1 분리밸브에 이르게 된다. 제1 분리밸브는 유입되는 유체를 제1 트랩밸브(400a) 또는 제2 트랩밸브(400b)로 선택적으로 배출가능하게 하는 밸브이다. 이를 위해 제1 분리밸브(600a)는 제1 유입포트(601), 제2 유입포트(602), 제1 유출포트(603) 및 제2 유출포트(604)를 포함할 수 있다.

[74] 제1 분리밸브(600a)는 제1 유입포트(601)와 제1 유출포트(603), 제2 유입포트(602)와 제2 유출포트(604)가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드와, 제1 유입포트(601)와 제2 유출포트(604), 제2 유입포트(602)와 제1 유출포트(603)가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드를 포함할 수 있다. 다기능 분리밸브(300)를 통과한 제1 용매가 제1 트랩밸브(400a)에 이르게 하기 위해 제1 분리밸브(600a)는 상술한 제1 모드 상태에 있게 된다.

[75] 제1 분리밸브(600a)가 제1 모드인 상태에서 제1 용매는 제1 트랩밸브(400a)로 이송된다. 제1 트랩밸브(400a)는 제1 고체상 추출칼럼(410a)과 연통되는 고체상 추출칼럼 연결포트(402), 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)과 연통되는 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트(406), 제1 유입포트(401), 제2 유입포트(404), 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프(407)에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트(403), 및 방출포트(405)를 포함할 수 있다.

[76] 시료를 함유한 제1 용매가 제1 고체상 추출칼럼에 유입되기 위해, 제1 트랩밸브(400a)는, 도 3에 도시된 바와 같이, 제1 유입포트(401)와 고체상

추출칼럼 연결포트(402), 시료이동루프 연결포트(403)와 방출포트(405), 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트(406)와 제2 유입포트(404)가 각각 서로 유체연통되도록 모드를 설정할 수 있다.

[77] 따라서, 다기능 선택밸브(300)로부터 배출되어 제1 용매와 함께 이송된 시료는 제1 유입포트(401)를 경유하여 고체상 추출칼럼 연결포트(402)를 통해서 제1 고체상 추출칼럼(410a)으로 주입된다. 이 때, 주입되는 시료의 흐름방향(또는 제1 용매의 흐름방향)은 도시된 화살표 방향과 같다.

[78] 고체상 추출칼럼(410a. 410b)은 고체상 추출칼럼 연결포트(402)에 직접 결합된 칼럼으로서, 본 발명에 있어서, 고체상 추출칼럼은 50㎛ 내지 500㎛의 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, 유입되는 시료의 흐름방향과 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 향해 용출되는 시료의 흐름방향이 서로 반대이므로 더욱 향상된 시료 분리분해능을 달성할 수 있다.

[79] 또한, 본 발명에서는 고체상 추출칼럼(410a, 410b)으로 내부 인듀서 (internal inducer)의 스테인레스 스틸 라이너(liner)를 사용할 수 있으며, C18 등의 물질을 내부에 충진시킨 다음, 양 말단을 약 2㎛ 정도의 세공 크기를 갖는 스테인레스 스틸 스크린으로 막아서 충진물의 유출을 차단함으로써, 높은 압력에 견딜 수 있는 견고한 고체상 추출 칼럼을 이용할 수 있다.

[80] 또한, 방출포트(405)는 시료 중에 함유된 염 성분을 함께 방출함으로써, 효율적인 탈염 공정이 이루어질 수 있도록 한다.

[81] 이러한 과정에 의해서 상기 시료의 탈염이 진행되는 동안 고체상 추출칼럼 내에서의 유속은 1.8 ㎕/분 내지 3.0 ㎕/분으로 조절될 수 있다.

[82] 고체상 추출칼럼 내에서의 유속을 1.8 ~ 3.0 ㎕/분으로 제한하는 이유는 탈염 효율의 증가, 생성되는 내부 압력 증가의 방지 및 고체상 추출칼럼에서 시료의 유실을 최소화를 보장하기 위해서이다.

[83] 다음으로, 제1 용매가 시료분리칼럼을 통과하게 하여 시료를 분획한 다음 시료의 탈염 및 농축 효율을 높일 수 있는 2차원 분리기능을 설명한다.

[84] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 2차원 분리기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[85] 제1 트랩밸브(400a)의 제1 고체상 추출칼럼(410a)에서 2차원 분리기능을 수행하기 위해서는 1차원 분리기능에서의 시료유입밸브(100), 연결밸브(200) 및 제1 트랩밸브(400b)의 밸브 구성은 그대로 유지하고, 다기능 선택밸브(300)의 모드를 유체통과모드에서 칼럼통과모드로 전환시키면 된다. 즉, 도 4에 도시된 바와 같이 다기능 선택밸브의 칼럼통과모드란, 유입되는 유체가

시료분리칼럼(310)을 통과하여 트랩밸브 쪽으로 배출되도록 하는 것으로서, 이 칼럼통과모드에서는 유입포트(301)와 제1 시료분리칼럼 연결포트(302), 유출포트(307)와 제2 시료분리칼럼 연결포트(303)가 각각 서로 유체연통되며, 이 때 제2 선택포트(305)와 제3 선택포트(306)은 서로 유체연통될 수 있다.

[86] 여기서, 시료분리칼럼(310)은 역상 액체크로마토그래피칼럼과 결합하여 2차원 분리기능을 수행할 수 있는 모든 칼럼이 될 수 있다. 예를 들면, 강양이온교환(Strong Cation eXchange, SCX)칼럼, 약음이온교환(Weak Anion eXchange, WAX)칼럼, 힐릭(Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC)칼럼, 강약이온혼합(SCX-WAX MIXED)칼럼 등이 시료분리칼럼으로 이용될 수 있다.

[87] 9포트의 다기능 선택밸브(300')에서는 유입되는 유체가 이산화티타늄칼럼(311)을 통과하지 않고 시료분리칼럼(310)을 통과하여 배출되어야 하기에 제1 선택포트(304)와 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트(309), 제2 선택포트(305)와 제3 선택포트(306)가 각각 서로 유체연통될 수 있다.

[88] 이와 같은 밸브의 구성을 통해 다기능 선택밸브(300)에 유입된 제1 용매는 시료분리칼럼(310)을 통과하여 제1 트랩밸브(400a)의 제1 고체상 추출칼럼(410a)에 주입될 수 있으며, 이로 인해 시료의 분획이 이루어진 후에 시료의 탈염 및 시료의 농축 효율을 더욱 높일 수 있다.

[89] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서 인산화펩티드 추출기능을 수행하는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[90] 제1 트랩밸브(400a)의 제1 고체상 추출칼럼(410a)에서 인산화펩티드 추출기능을 수행하기 위해서는 2차원 분리기능에서의 시료유입밸브(100), 연결밸브(200) 및 제1 트랩밸브(400b)의 밸브 구성은 그대로 유지하되, 다기능 선택밸브(300')에는 이산화티타늄칼럼(311)이 연결되어야 하며, 다기능 선택밸브(300')의 모드를 이산화티타늄칼럼통과모드로 변경시키면 된다. 즉, 도 5에 도시된 바와 같이 다기능 선택밸브의 이산화티타늄칼럼통과모드란, 유입되는 유체가 이산화티타늄칼럼(311)을 통과하여 트랩밸브 쪽으로 배출되도록 하는 것으로서, 이산화티타늄칼럼통과모드에서는 유입포트(301)와 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트(308), 유출포트(307)와 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트(309)가 각각 서로 유체연통되며, 이 때 제1 선택포트(304)와 제1 시료분리칼럼 연결포트(302), 제2 선택포트(305)와 제3 선택포트(306)는 각각 서로 유체연통될 수 있다.

[91] 이와 같은 밸브의 구성을 통해 다기능 선택밸브(300')에 유입된 제1 용매는 이산화티타늄칼럼(311)을 통과하여 제1 트랩밸브(400a)의 제1 고체상 추출칼럼(410a)에 주입될 수 있으며, 이로 인해 인산화된 펩티드를 추출할 수 있다.

[92] 지금까지는 시료가 시료유입포트(101)를 통하여 시료저장루프(107)에 소정량 채워진 다음 제1 용매를 이용하여 시료의 온라인 소화기능이 수행되고, 제1

트랩밸브(400a)에 유체연통된 제1 고체상 추출칼럼(410a)에서 1차원 분리기능, 2차원 분리기능 및 인산화펩티드 추출기능이 수행되는 과정을 설명하였다.

[93] 다음 과정으로는, 제1 고체상 추출칼럼(410a)에 주입된 시료를 제2 용매를 사용하여 분리함으로써 시료를 분석하는 과정이 수행되어야 하는 바, 이하 이에 대해서 설명하기로 한다.

[94] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 자동화 이중 온라인 역상 액체크로마토그래피 장치에서, 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 시료 분석이 이루어지는 동안 제2 고체상 추출칼럼 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 평형화가 이루어지는 과정에서의 각 밸브의 구성도이다.

[95] 시료분석과정에서의 용매는 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매가 사용되며, 혼합용매의 비율을 달리하여 용매 기울기를 통해 시료의 분리가 이루어진다.

[96] 도 6을 참조하면, 제2 용매공급펌프(500b)를 통해 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매를 제1 트랩밸브(400a)에 공급한다. 이 때, 제2 분리밸브(600b)는 제2 용매공급펌프(500b)로부터 공급되는 혼합용매를 제1 트랩밸브(400a)로 안내하는 역할을 한다.

[97] 제2 분리밸브(600b)는 전술한 제1 분리밸브(600a)와 같이 유입되는 유체를 제1 트랩밸브(400a) 또는 제2 트랩밸브(400b)로 선택적으로 배출할 수 있게 하는 밸브이다. 이를 위해, 제2 분리밸브(600b)는 제1 유입포트(601), 제2 유입포트(602), 제1 유출포트(603) 및 제2 유출포트(604)를 포함할 수 있다.

[98] 제2 분리밸브(600b)는 제1 유입포트(601)와 제1 유출포트(603), 제2 유입포트(602)와 제2 유출포트(604)가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드와, 제1 유입포트(601)와 제2 유출포트(604), 제2 유입포트(602)와 제1 유출포트(603)가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드를 포함할 수 있다. 제2 용매공급펌프(500b)로부터 공급되는 혼합용매를 제1 트랩밸브(400a)로 이송시키기 위해서는 도 6에 도시된 바와 같이 제2 분리밸브의 모드를 상술한 제2 모드로 변경시킨다.

[99] 제2 분리밸브(600b)를 통과한 혼합용매는 제1 트랩밸브(400a)로 유입되며, 제1 트랩밸브에 유체연통된 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼에서 시료의 분석이 이루어지기 위해서 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트(406)와 고체상 추출칼럼 연결포트(402), 제2 유입포트(404)와 시료이동루프 연결포트(403)가 각각 서로 유체연통되도록 제1 트랩밸브(400a)의 모드를 변경한다. 이 때, 제1 유입포트(401)와 방출포트(404)는 서로 유체연통될 수 있다. 따라서, 제2 유입포트(404)를 통해 유입된 혼합용매는 시료이동루프(407)를 거쳐 제1 고체상 추출칼럼(410a)에 이르고, 고체상 추출칼럼 연결포트(402)와 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트(406)를 거쳐 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)을 통과하게 된다. 이 경우, 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)을 향해 용출되는 시료의 흐름방향(또는

혼합용매의 흐름방향)은 화살표와 같으며, 이는 제1 고체상 추출칼럼(410a)으로 유입되는 시료의 흐름방향(또는 제1 용매의 흐름방향)과 반대이므로, 시료의 분리 분해능을 더욱 개선시킬 수 있다.

[100] 제1 고체상 추출칼럼(410a)에서의 시료 분리는 제2 용매공급펌프(500b)로부터 공급되는 혼합용매 중의 제1 용매 및 제2 용매 비율을 시간 경과에 따라 변화시켜가며 수행된다. 즉, 혼합용매 중의 제2 용매 비율이 증가할수록 제1 고체상 추출칼럼(410a)에 결합된 시료의 해리 정도가 증가하여 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(420a)으로 유입되고, 이후 시료의 분리를 통해 분석이 이루어진다.

[101] 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 아세토니트릴 수용액이 사용될 수 있다. 즉, 이는 전체 용매 중 아세토니트릴의 함량이 증가할수록 고체상 추출 칼럼에 결합된 시료의 해리 정도가 증가하는 시스템을 채택한 것이라 할 수 있다.

[102] 시료의 분리가 수행되는 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼(420a)은 10㎛ 내지 150㎛의 내경 및 10cm 내지 150cm의 길이를 갖는 것이 바람직하며, 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)은 질량 분석기(mass spectrometer)에 연결됨으로써, 후속 분석 공정이 수행될 수 있다.

[103] 이와 같이 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼(420a)에서 시료의 분석이 이루어지는 동안, 제1 용매공급펌프로부터 공급되는 제1 용매를 이용하여 제2 고체상 추출칼럼(410b) 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼(420b)을 평형화시킬 수 있다.

[104] 이를 위해서는 도 6에 도시된 바와 같이 제1 용매공급펌프(500a)로부터의 제1 용매가 제2 트랩밸브(400b)를 통과하도록 연결밸브(200)의 모드를 변경시킨다.

[105] 즉, 제1 용매공급펌프(500a)로부터 공급되는 제1 용매가 연결밸브(200)를 거쳐 제2 분리밸브(600b)에 이르도록, 연결밸브(200)의 제2 유입포트(202), 제2 연결포트(204), 제1 연결포트(203), 제2 유출포트(206)가 순차적으로 유체연통되도록 연결밸브(200)의 모드를 변경한다. 이 경우에도 연결밸브 내의 유로 형상은 Z형상이 유지될 수 있다.

[106] 이 때, 제2 분리밸브(600b)에서는 제1 유입포트(601)와 제2 유출포트(604)가 서로 유체연통되어 있기 때문에, 제1 용매는 제2 분리밸브를 거쳐 제2 트랩밸브(600b)로 향할 수 있다.

[107] 한편, 제2 고체상 추출칼럼(410b) 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼(420b)의 평형화를 위해, 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트(406)와 고체상 추출칼럼 연결포트(402), 제2 유입포트(404)와 시료이동루프 연결포트(403)가 각각 서로 유체연통되도록 제2 트랩밸브(400b)의 모드를 변경한다.

[108] 따라서, 제2 트랩밸브(400b)로 유입된 제1 용매가 제2 고체상 추출칼럼(410b) 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼(420b)을 지나면서 이들의 평형화가 가능하게 된다.

[109] 지금까지는 제1 역상 크로마토그래피칼럼에서 시료의 분석이 이루어지는 동안 제2 고체상 추출칼럼 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼의 평형화가 이루어지는 과정에 대해 설명하였으나, 그 반대의 과정, 예컨대 제2 역상 크로마토그래피칼럼에서 시료의 분석이 이루어지는 동안 제1 고체상 추출칼럼 및 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼의 평형화가 가능함은 물론이다.

[110] 아울러, 본 실시예에서는 제1 용매를 이용하여 온라인 소화기능, 1차원 분리기능, 2차원 분리기능, 인산화펩티드 추출기능을 모두 수행하고, 이후 혼합용매를 이용하여 시료를 분리 및 분석하는 과정을 일 예로 들어 설명하였지만, 필요에 따라 다양한 조합이 가능하다. 예를 들면, 혼합용매를 사용하여 시료의 분리 및 분석이 이루어지기 전에, 1차원 분리기능만을 수행하거나, 1차원 분리기능 및 2차원 분리기능을 함께 수행하거나, 먼저 온라인 소화기능을 사용하여 실험을 수행한 후 1차원 분리기능 또는 2차원 분리기능을 선택하여 수행할 수 있다. 나아가, 상술한 각 과정에서 인산화펩티드 추출기능을 추가로 수행할 수 있다.

[111] 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.

산업상 이용가능성

[112] 본 발명은 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 이용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 분석 대상이 되는 시료가 로딩되는 시료유입밸브;
제1 고체상 추출칼럼 및 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제1 트랩밸브;
제2 고체상 추출칼럼 및 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는, 제2 트랩밸브;
유입되는 유체를 상기 제1 트랩밸브 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 각각 배출시키는 제1 분리밸브 및 제2 분리밸브;
상기 시료유입밸브에서 상기 제1, 제2 트랩밸브로 향하는 유로에 위치하며, 시료분리칼럼이 연결되는 다기능 선택밸브; 및
상기 시료유입밸브로부터 유출되는 유체를 상기 다기능 선택밸브, 상기 제1 트랩밸브, 또는 상기 제2 트랩밸브로 선택적으로 공급하는 연결밸브;를 포함하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치에 용매를 공급하는 제1 용매공급펌프 및 제2 용매공급펌프를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 제1 용매공급펌프는 시료유입밸브 또는 상기 연결밸브에 유체연통되어 있고, 상기 제2 용매공급펌프는 상기 제2 분리밸브에 유체연통되어 있는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 제1 용매공급펌프는 T형 용매분리관을 통해 상기 시료유입밸브 또는 상기 연결밸브에 선택적으로 용매를 공급하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 5] 제2항에 있어서,
상기 제1 용매공급펌프 및 상기 제2 용매공급펌프 중 하나 이상에는 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매의 혼합용매를 공급할 수 있도록 용매선택밸브가 설치된 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 시료유입밸브는, 시료유입포트, 시료방출포트, 시료저장루프에 의해 서로 연결된 제1 시료저장루프 연결포트 및

제2 시료저장루프 연결포트, 용매유입포트, 및 용매유출포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 시료유입밸브는,
상기 시료유입포트와 상기 제1 시료저장루프 연결포트가 유체연통되고, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 시료방출포트가 유체연통되는 제1 모드; 및
상기 제1 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유출포트가 유체연통되며, 상기 제2 시료저장루프 연결포트와 상기 용매유입포트가 유체연통되는 제2 모드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 연결밸브는, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 제1 연결포트, 제2 연결포트, 제1 유출포트 및 제2 유출포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 연결밸브는,
상기 제1 유입포트, 상기 제1 연결포트, 상기 제2 연결포트, 상기 제1 유출포트가 순차적으로 유체연통되는 제1 모드; 및
상기 제2 유입포트, 상기 제2 연결포트, 상기 제1 연결포트, 상기 제2 유출포트가 순차적으로 유체연통되는 제2 모드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 연결밸브에는 서로 유체연통된 포트들 사이에 Z형 유로가 형성되는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 11] 제1항에 있어서,
상기 다기능 선택밸브는,
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체를 유입하여 상기 트랩밸브로 배출시키는 유체통과모드;
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 시료분리칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 칼럼통과모드; 및
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체의 내부 유입을 방지하는 유체폐쇄모드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중

온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 다기능 선택밸브는, 유입포트, 유출포트, 상기 시료분리칼럼의 양단과 각각 연결되는 제1 시료분리칼럼 연결포트 및 제2 시료분리칼럼 연결포트, 상기 모드들을 구현하도록 다른 포트들과 선택적으로 유체연통되는 복수의 선택포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 13] 제12항에 있어서,
상기 유체통과모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체연통되고,
상기 칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 시료분리칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 시료분리칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되며,
상기 유체폐쇄모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체단절되는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 14] 제1항에 있어서,
상기 다기능 선택밸브에는 이산화티타늄칼럼이 더 연결되고,
상기 다기능 선택밸브는,
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체를 유입하여 상기 트랩밸브로 배출시키는 유체통과모드;
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 시료분리칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 칼럼통과모드;
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체의 내부 유입을 방지하는 유체폐쇄모드; 및
상기 시료유입밸브로부터 배출되는 유체가 상기 이산화티타늄칼럼을 통과하여 상기 트랩밸브로 배출되도록 하는 이산화티타늄칼럼통과모드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 15] 제14항에 있어서,
상기 다기능 선택밸브는, 유입포트, 유출포트, 상기 시료분리칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 시료분리칼럼 연결포트 및 제2 시료분리칼럼 연결포트, 상기 이산화티타늄칼럼의 양단에 각각 연결되는 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트 및 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트, 상기 모드들을 구현하도록 다른 포트들과 선택적으로 유체연통되는 복수의 선택포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인

다기능 액체크로마토 그래피 장치.

[청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 유체통과모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체연통되고,
상기 칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 시료분리칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 시료분리칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되고,
상기 유체폐쇄모드에서 상기 유입포트와 상기 유출포트가 유체단절되고,
상기 이산화티타늄칼럼통과모드에서 상기 유입포트와 상기 제1 이산화티타늄칼럼 연결포트, 상기 유출포트와 상기 제2 이산화티타늄칼럼 연결포트가 각각 서로 유체연통되는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 17] 제1항에 있어서,
상기 제1 트랩밸브는,
상기 제1 고체상 추출칼럼과 유체연통되는 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제1 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 상기 제1 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 방출포트를 포함하고,
상기 제2 트랩밸브는,
상기 제2 고체상 추출칼럼과 유체연통되는 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제2 역상 액체크로마토그래피칼럼과 유체연통되는 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트, 제1 유입포트, 제2 유입포트, 상기 제2 고체상 추출칼럼 연결포트와 시료이동루프에 의해 연결된 시료이동루프 연결포트, 및 방출포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 18] 제17항에 있어서,
상기 제1 트랩밸브 및 상기 제2 트랩밸브 각각은,
상기 고체상 추출칼럼 연결포트와 상기 제1 유입포트, 상기 시료이동루프 연결포트와 상기 방출포트가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드; 및
상기 역상 액체크로마토그래피칼럼 연결포트와 상기 고체상 추출칼럼 연결포트, 상기 제2 유입포트와 상기 시료이동루프 연결포트가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드;를 포함하는 것을

특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 19] 제1항에 있어서,
상기 제1 분리밸브 및 제2 분리밸브 각각은,
제1 유입포트, 제2 유입포트, 제1 유출포트 및 제2 유출포트를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

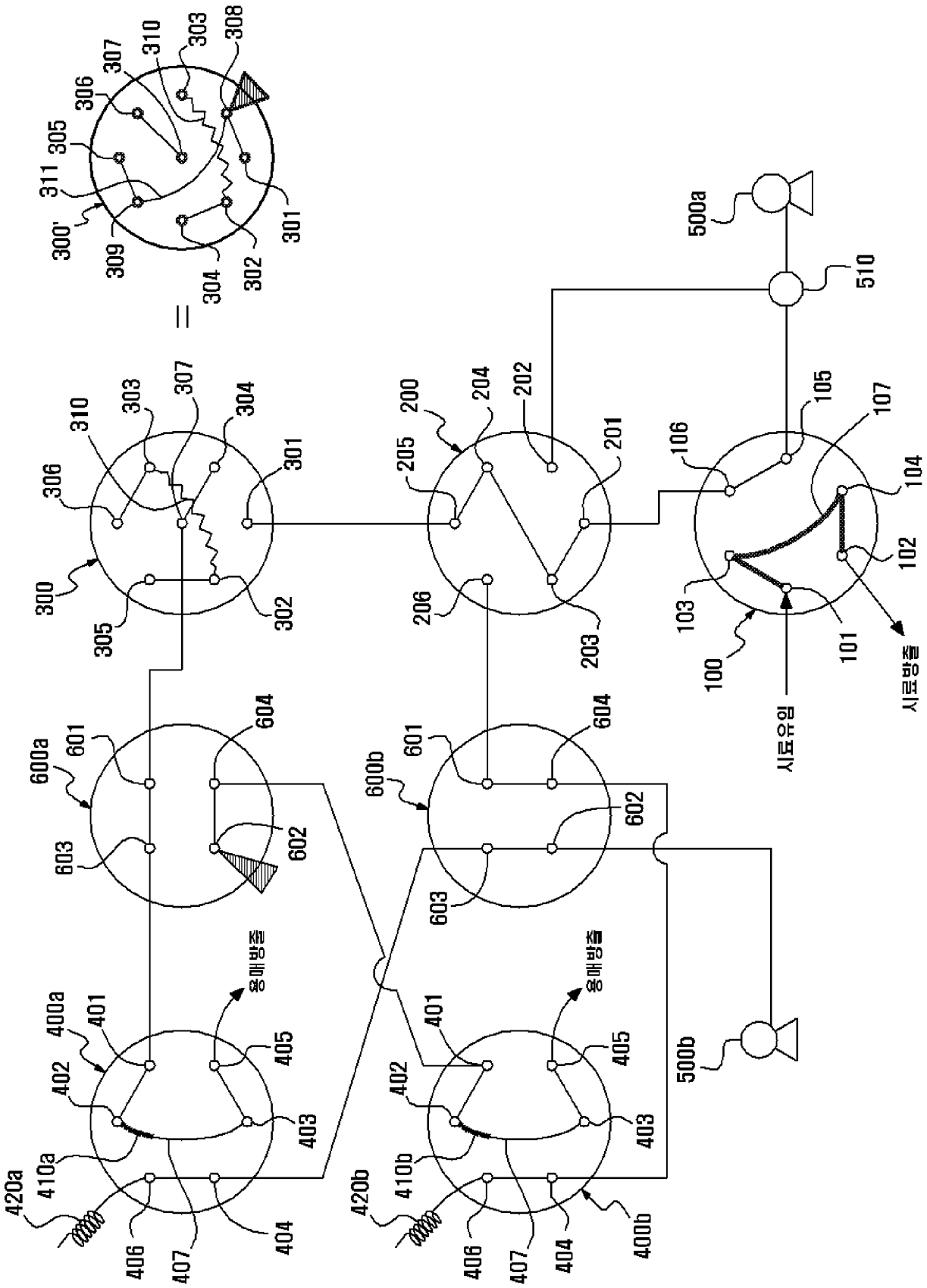
[청구항 20] 제19항에 있어서,
상기 제1 분리밸브 및 상기 제2 분리밸브 각각은,
상기 제1 유입포트와 상기 제1 유출포트, 상기 제2 유입포트와 상기 제2 유출포트가 각각 서로 유체연통되는 제1 모드; 및 상기 제1 유입포트와 상기 제2 유출포트, 상기 제2 유입포트와 상기 제1 유출포트가 각각 서로 유체연통되는 제2 모드;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 21] 제1항에 있어서,
상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 상기 시료가 분석되는 동안 상기 제2 고체상 추출칼럼 및 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 평형화가 이루어지는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

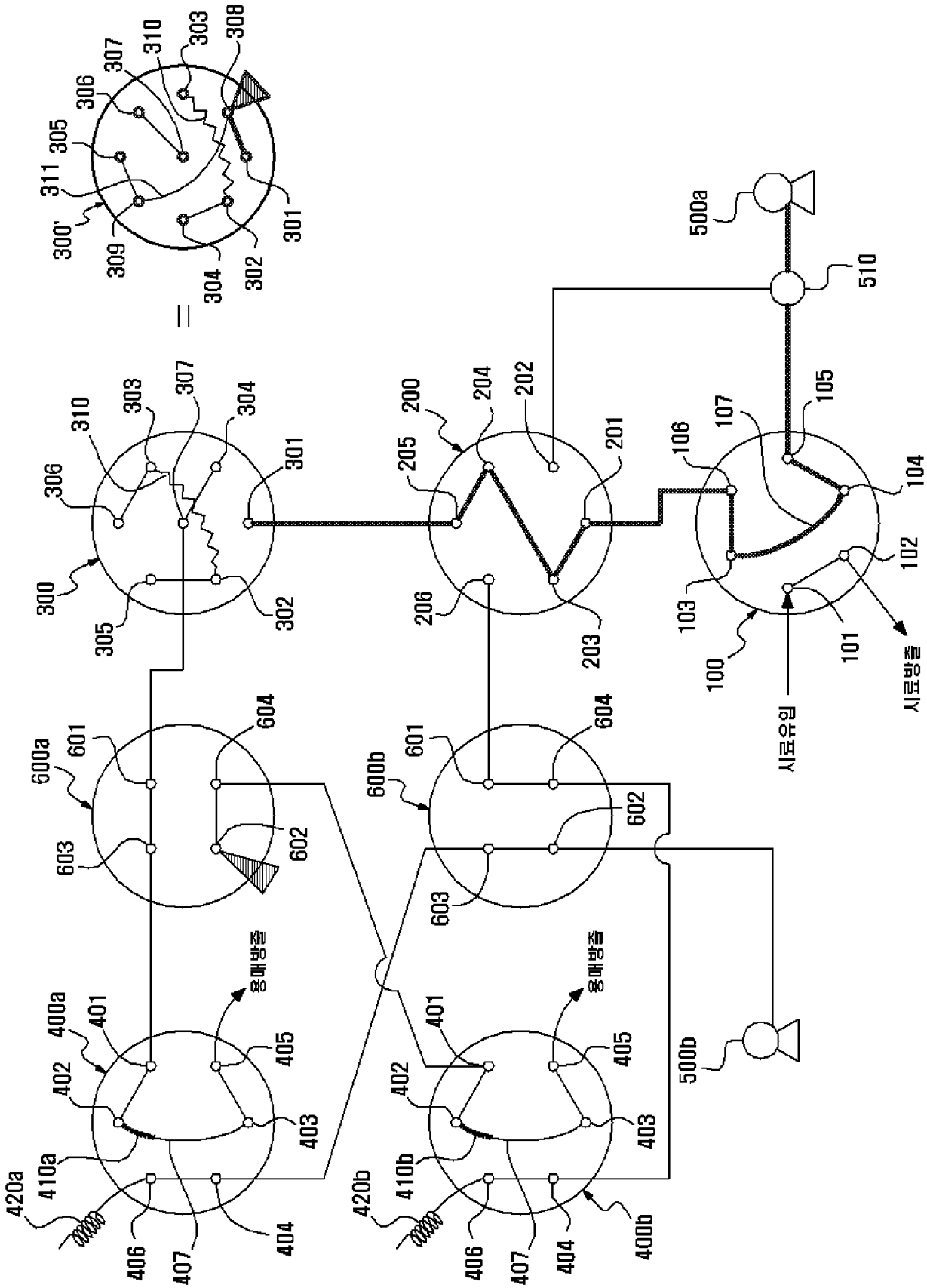
[청구항 22] 제1항에 있어서,
상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 상기 시료가 분석되는 동안 상기 제1 고체상 추출칼럼 및 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼에서 평형화가 이루어지는 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

[청구항 23] 제1항에 있어서,
상기 제1 고체상 추출칼럼에서, 유입되는 시료의 흐름방향과 상기 제1 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 향해 용출되는 시료의 흐름방향은 서로 반대이고,
상기 제2 고체상 추출칼럼에서, 유입되는 시료의 흐름방향과 상기 제2 역상 액체크로마토그래피 칼럼을 향해 용출되는 시료의 흐름방향은 서로 반대인 것을 특징으로 하는 자동화 이중 온라인 다기능 액체크로마토그래피 장치.

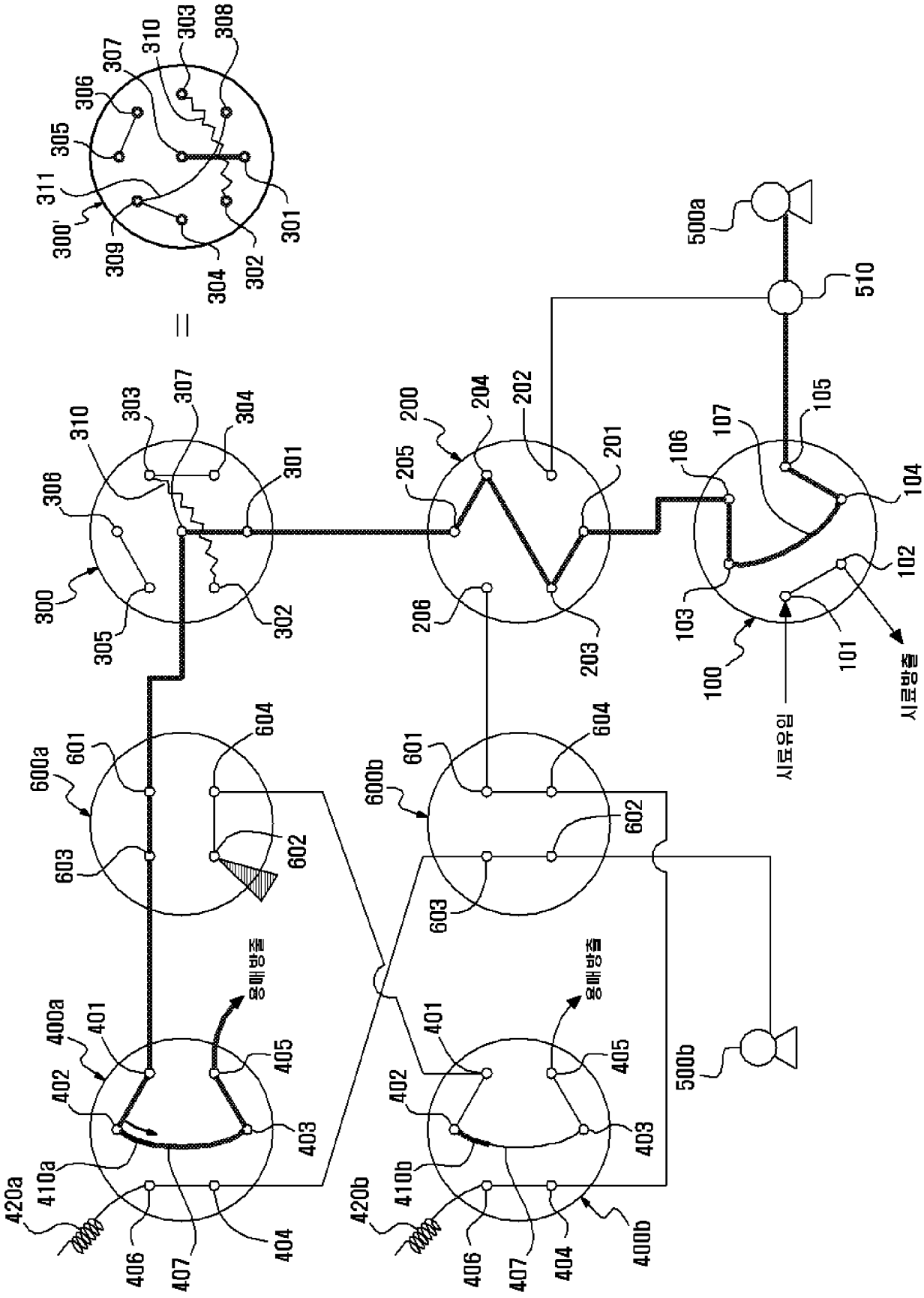
[Fig. 1]



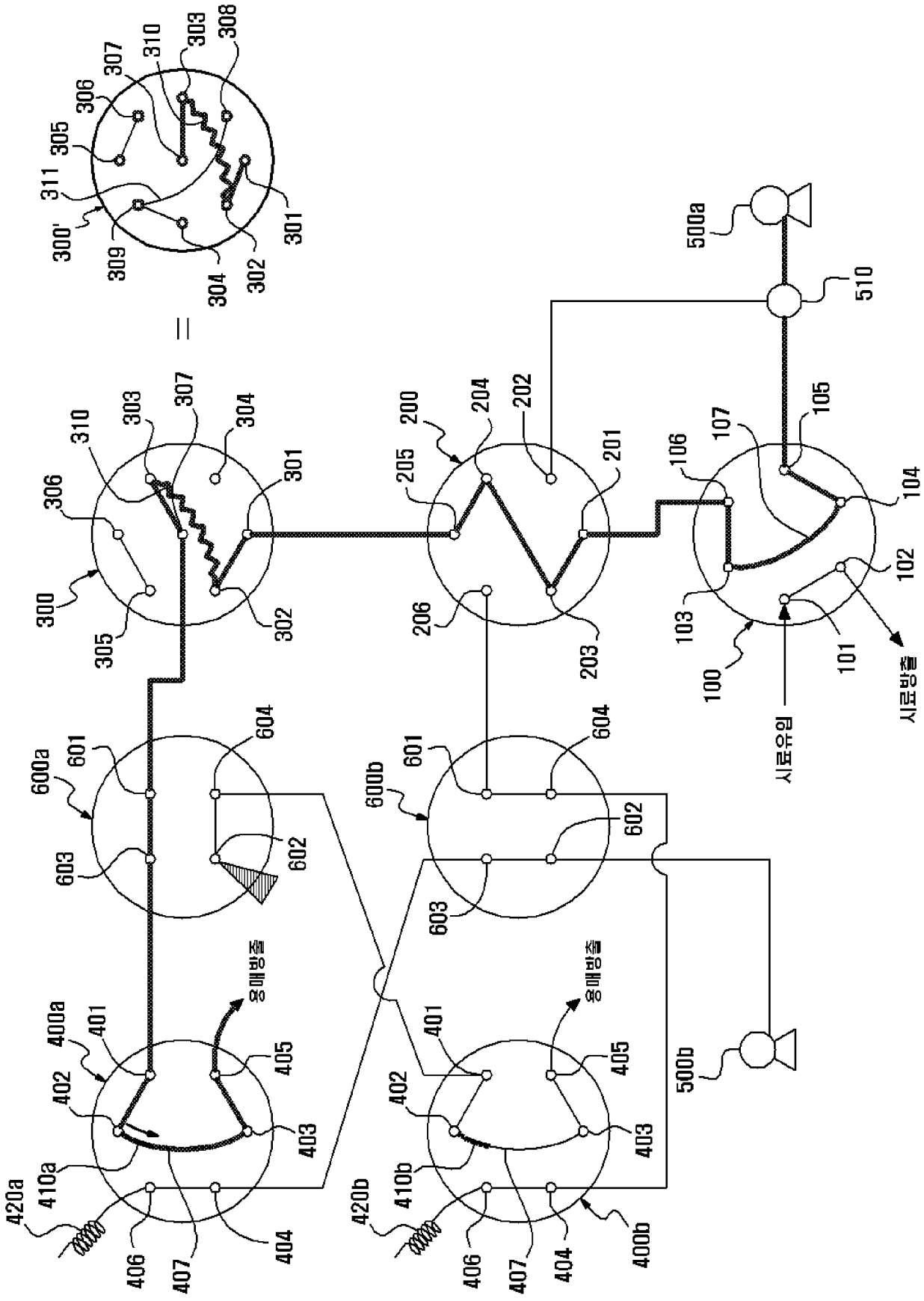
[Fig. 2]


300'
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
=
300
301
302
303
304
305
306
307
310
200
201
202
203
204
205
206
100
101
102
103
104
105
106
107
시료방출
시료유입
500a
510
600a
600b
601
602
603
604
400a
400b
401
402
403
404
405
406
407
410a
410b
420a
420b
용매방출
500b

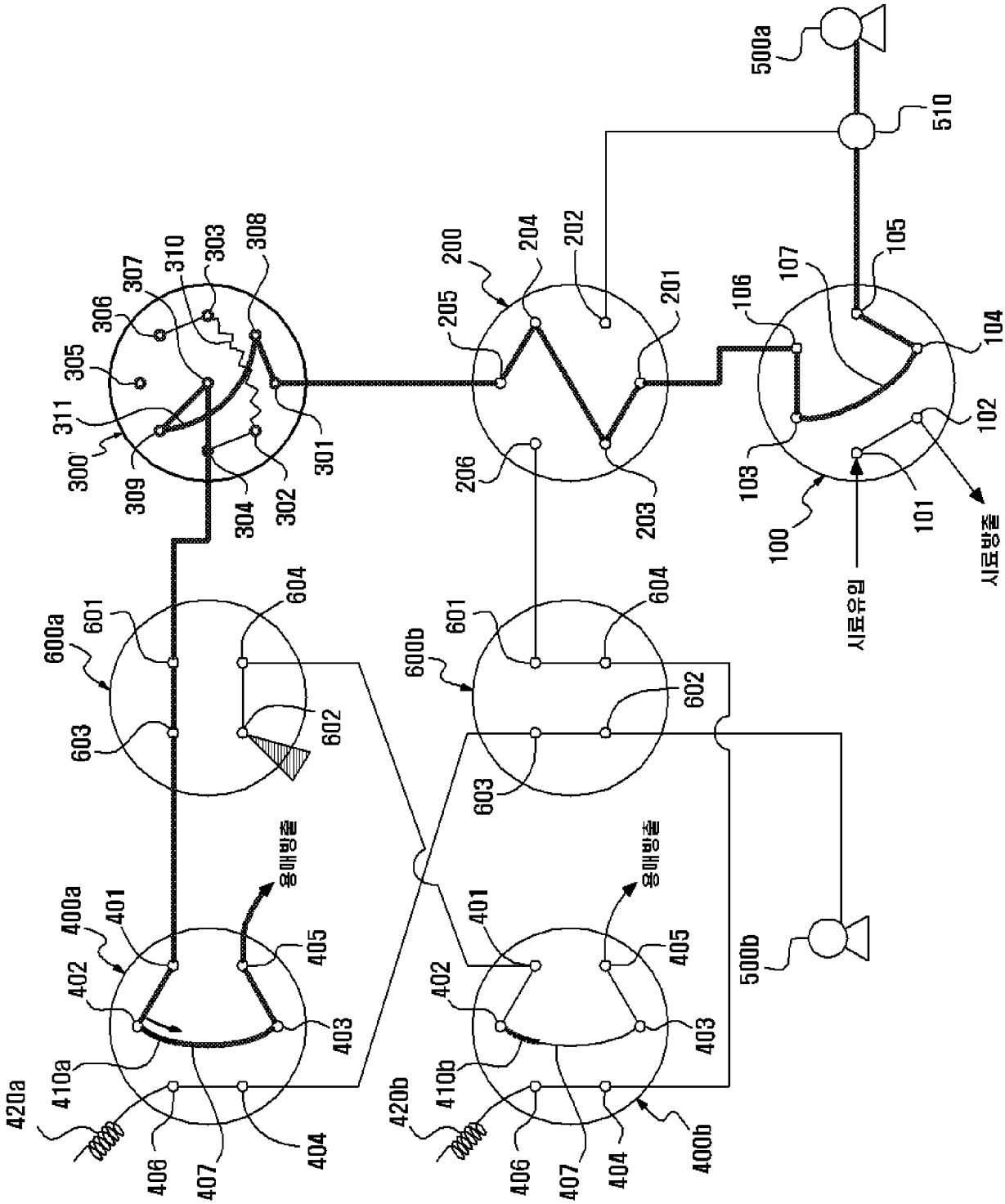
[Fig. 3]



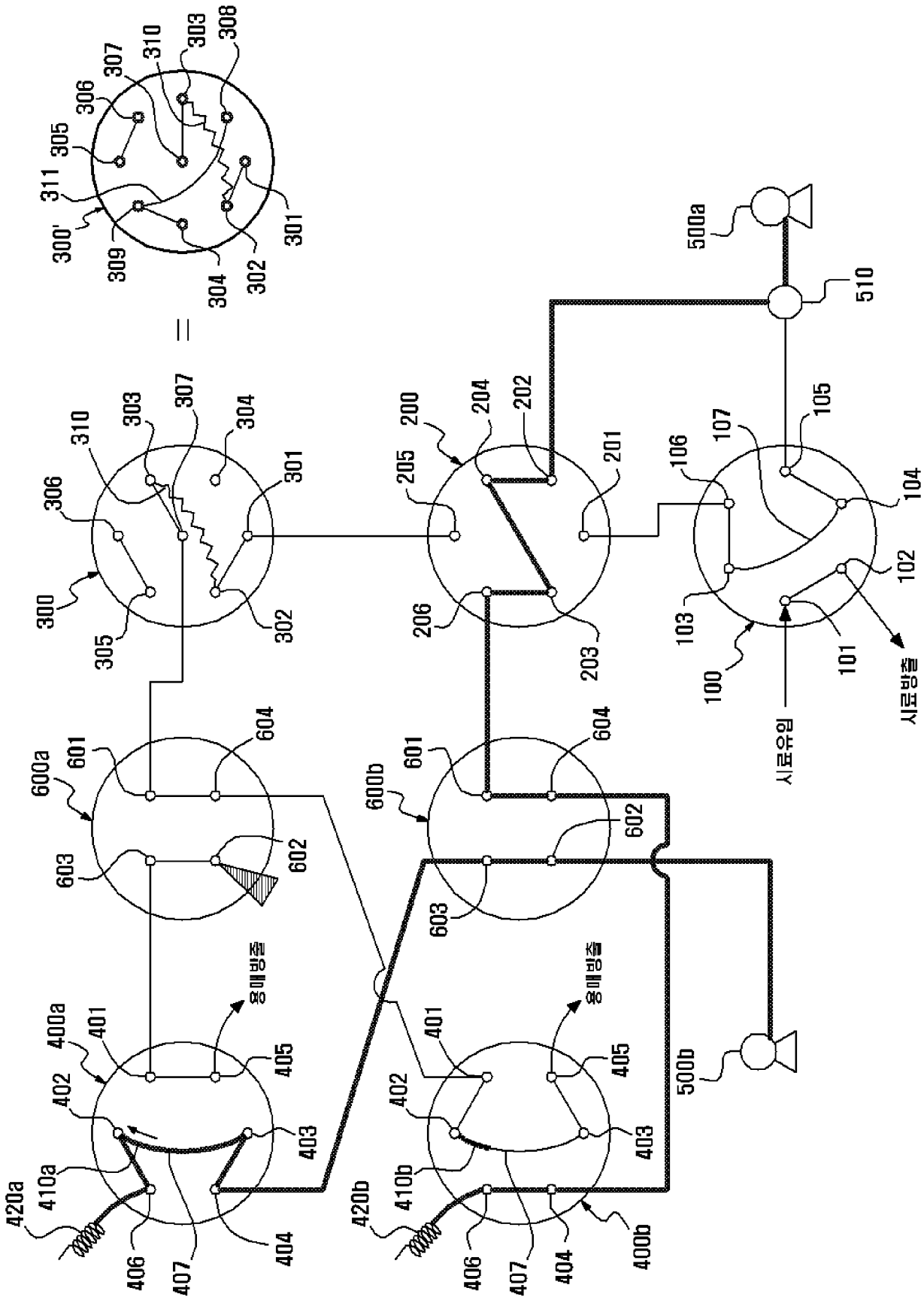
[Fig. 4]


300'
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
=
300
301
302
303
304
305
306
307
310
200
201
202
203
204
205
206
100
101
102
103
104
105
106
107
500a
510
시료유입
시료방출
600a
600b
601
602
603
604
400a
400b
401
402
403
404
405
406
407
410a
410b
420a
420b
500b
용매방출

[Fig. 5]


500a
510
200
204
202
201
205
206
203
105
107
106
104
102
103
101
100
시료유입
시료방출
300
311
305
306
307
310
303
308
309
304
302
301
600a
601
604
603
602
600b
601
604
602
603
400a
401
402
405
403
410a
420a
406
407
404
용매방출
401
402
405
403
410b
420b
406
407
404
400b
용매방출
500b

[Fig. 6]


300'
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
=
300
301
302
303
304
305
306
307
310
200
201
202
203
204
205
206
100
101
102
103
104
105
106
107
시료방출
시료유입
500a
510
600a
600b
601
602
603
604
400a
400b
401
402
403
404
405
406
407
410a
410b
420a
420b
500b
용매방출