(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0113958
(43) 공개일자 2023년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/46 (2006.01) *G01N 30/20* (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/468 (2013.01)
G01N 30/20 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0009849
(22) 출원일자 2022년01월24일
심사청구일자 2022년01월24일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 베르티스
경기도 성남시 분당구 돌마로 172, 4층 403호(정자동, 분당서울대학교병원 헬스케어혁신파크)
(72) 발명자
이상원
서울특별시 성북구 고려대로17가길 64, 108동 602호(안암동1가, 래미안 안암)
강채원
서울특별시 동대문구 안암로 98, 안암글로벌하우스 G407-1(제기동)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 17 항

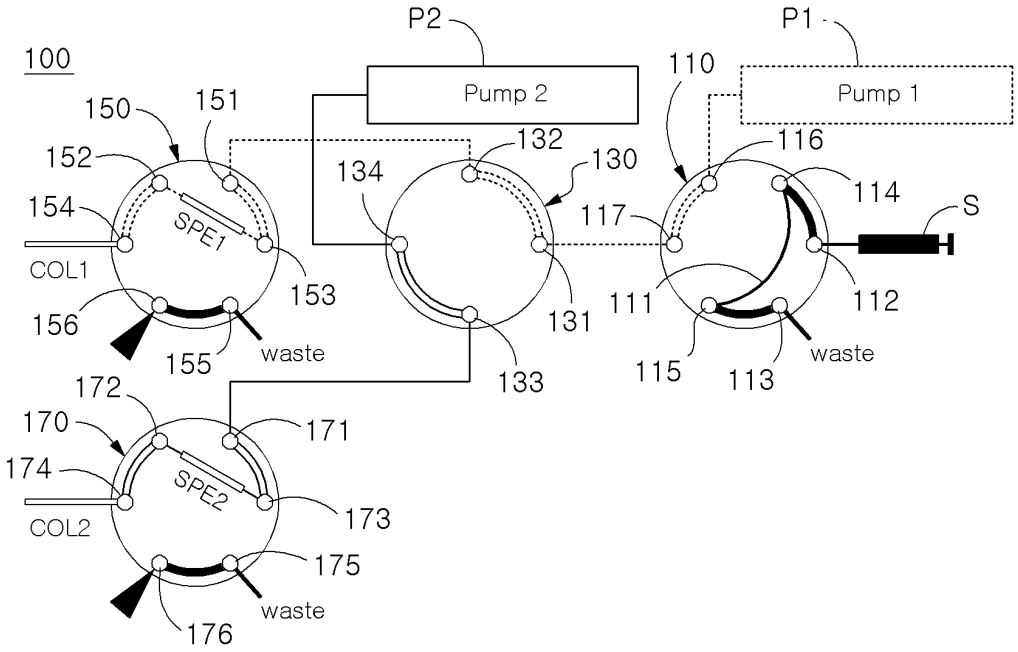
(54) 발명의 명칭 **상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치 및 그 제어 방법**

(57) 요 약

상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치 및 그 제어방법이 개시된다. 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치는, 제1 용매 또는 상기 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제1 펌프; 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제2 펌프; 제1 펌프와 시료를 주입

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



하는 시료주입기가 연결된 시료 유입밸브; 제1 시료 분리컬럼이 연결되며, 제1 시료 분리컬럼에 연결되는 제1 고체상 추출컬럼을 구비한 제1 컬럼밸브; 제2 시료 분리컬럼이 연결되며, 제2 시료 분리컬럼에 연결되는 제2 고체상 추출컬럼을 구비한 제2 컬럼밸브; 및 제2 펌프가 연결되되, 시료 유입밸브와 제1 컬럼밸브 및 제2 컬럼밸브 사이에 마련되어 제1 시료 분리컬럼 및 제2 시료 분리컬럼 중 어느 하나에 시료 유입밸브에서 공급된 시료를 주입하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 다른 하나의 세척 및 평형화와 시료주입 및 등용매 용출(isocratic elution)이 가능하게 하는 컬럼 선택밸브를 포함한다.

(52) CPC특허분류
G01N 30/7233 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711133269
과제번호 2017M3C9A5031597
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업(과기부)(R&D)
연구과제명 췌장암 치료불응성 예측기술 개발을 위한 유전단백체 분석 및 기전 규명
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345346358
과제번호 2019R1A6C1010028
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국기초과학지원연구원
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 핵심연구지원센터조성지원과제(유전단백체연구센터)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

제1 용매 또는 상기 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제1 펌프;

상기 제1 용매 또는 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제2 펌프;

상기 제1 펌프와 시료를 주입하는 시료주입기가 연결된 시료 유입밸브;

제1 시료 분리컬럼이 연결되며, 상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되는 제1 고체상 추출컬럼을 구비한 제1 컬럼밸브;

제2 시료 분리컬럼이 연결되며, 상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되는 제2 고체상 추출컬럼을 구비한 제2 컬럼밸브; 및

상기 제2 펌프가 연결되되, 상기 시료 유입밸브와 상기 제1 컬럼밸브 및 상기 제2 컬럼밸브 사이에 마련되어 상기 제1 시료 분리컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼 중 어느 하나에 상기 시료 유입밸브에서 공급된 시료를 주입하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 다른 하나의 세척 및 평형화와 시료주입 및 등용매 용출(isocratic elution)이 가능하게 하는 컬럼 선택밸브를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료 유입밸브는,

상기 시료주입기에 연결되는 시료 유입포트;

상기 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 시료 배출포트;

상기 제1 펌프에 연결되는 제1 펌프 연결포트;

상기 제1 펌프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 컬럼 선택밸브에 연결되는 제1 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 시료 유입포트와 상기 시료 배출포트에 연결된 상태에서 시료가 상기 시료 저장루프에 저장되고,

상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 용매와 함께 상기 컬럼 선택밸브에 공급되는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 컬럼 선택밸브는,

상기 시료 유입밸브에 연결되는 제1 유입포트;

상기 제1 컬럼밸브에 연결되는 제1 컬럼밸브 연결포트;

상기 제2 컬럼밸브에 연결되는 제2 컬럼밸브 연결포트; 및

상기 제2 펌프에 연결되는 제2 펌프 연결포트를 포함하며,

상기 시료 유입밸브와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입 및 등용매 용출이 가능하게 하며,

상기 시료 유입밸브와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입 및 등용매 용출이 가능하게 하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 컬럼밸브는,

상기 제1 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제1 고체상 추출컬럼 경로포트;

상기 컬럼 선택밸브에 연결되되, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 유입포트;

상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 시료 분리컬럼 연결포트; 및

상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 포함하며,

상기 제2 컬럼밸브는,

상기 제2 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제2 고체상 추출컬럼 경로포트;

상기 컬럼 선택밸브에 연결되되, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 유입포트;

상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 시료 분리컬럼 연결포트; 및

상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제3 배출포트를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치.

청구항 5

(A) 시료 유입밸브의 시료 저장루프에 시료를 저장하고, 동시에 제1 컬럼밸브의 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼과 제2 컬럼밸브의 제2 고체상 추출컬럼 및 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계;

(B) 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하며 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계;

(C) 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에서 등용매 용출(isocratic elution)을 하며 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계;

(D) 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에서 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입과 탈염 및 농축과 등용매 용출(isocratic elution)을 하는 단계;

(E) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석을 완료함과 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에서 등용매 용출을 완료하는 단계;

(F) 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에서 기울기 용출하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 세척 및 평형화와 시료주입과 탈염 및 농축과 등용매 용출을 하는 단계;

(G) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석을 완료함과 동시에 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼에서 등용매 용출을 완료하는 단계; 및

(H) 시료에 대한 분리 분석의 횟수 또는 시료의 개수에 따라 반복하여 상기 (D)단계 내지 상기 (G)단계를 순차

로 수행하되, 상기 (D)단계에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화 이전에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행하는 단계를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (A)단계는,

(A-1) 상기 시료 유입밸브에 연결된 시료주입기에서 시료를 상기 시료 저장루프에 주입하여 저장하는 단계;

(A-2) 상기 시료 유입밸브에 연결된 제1 펌프에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브를 경유하여 제1 컬럼밸브의 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계; 및

(A-3) 상기 컬럼 선택밸브에 연결된 제2 펌프에서 상기 제1 용매를 제2 컬럼밸브의 제2 고체상 추출컬럼 및 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시료 유입밸브는,

상기 시료주입기에 연결되는 시료 유입포트;

상기 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 시료 배출포트;

상기 제1 펌프에 연결되는 제1 펌프 연결포트;

상기 제1 펌프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 컬럼 선택밸브에 연결되는 제1 배출포트; 및

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

상기 (A-1) 단계는,

상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 시료 유입포트와 상기 시료 배출포트에 연결된 상태에서 시료가 상기 시료 저장루프에 저장되는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 컬럼 선택밸브는,

상기 제1 배출포트에 연결되는 제1 유입포트;

상기 제1 컬럼밸브에 연결되는 제1 컬럼밸브 연결포트;

상기 제2 컬럼밸브에 연결되는 제2 컬럼밸브 연결포트; 및

상기 제2 펌프에 연결되는 제2 펌프 연결포트를 포함하며,

상기 (A-2) 단계는,

상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하고,

상기 (A-3) 단계는,

상기 제2 펌프 연결포트와 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제1 용매를

상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제1 컬럼밸브는,

상기 제1 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제1 고체상 추출컬럼 경로포트;

상기 제1 컬럼밸브 연결포트에 연결되되, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 유입포트;

상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 시료 분리컬럼 연결포트; 및

상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 포함하며,

상기 제2 컬럼밸브는,

상기 제2 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제2 고체상 추출컬럼 경로포트;

상기 제2 컬럼밸브 연결포트에 연결되되, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 유입포트;

상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 시료 분리컬럼 연결포트; 및

상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제3 배출포트를 포함하며,

상기 (B) 단계는,

(B-1) 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제2 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되는 단계; 및

(B-2) 상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 (C) 단계는,

상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (D)단계는,

(D-1) 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 상기 시료 저장루프에 시료를 저장하는 단계;

(D-2) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 시료 저장루프에 주입하여 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제2 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하는 단계; 및

(D-3) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출을 하는 단계를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (D-1)단계는,

상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트를 연결하고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트를 연결한 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며, 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 평형화를 수행하고,

상기 (D-2)단계는,

상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제3 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제2 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되며,

상기 (D-3)단계는,

상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 (H)단계에서 반복하여 상기 (D)단계 내지 상기 (G)단계를 순차로 수행하는 경우에, 상기 (D-1) 단계에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화 이전에 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 (E) 단계는,

상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 상기 제2 시료 분리컬럼에서 첫번째 펩

티드가 용출되기 직전의 시점이 일치되는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 (F)단계는,

(F-1) 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행한 후 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 공급하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 상기 시료 저장루프에 시료를 저장하는 단계;

(F-2) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 시료 저장루프에 공급하여 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하는 단계; 및

(F-3) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 공급하여 등용매 용출을 하는 단계를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 (F-1)단계는,

상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트를 연결하고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트를 연결한 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며, 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 세척한 후 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 평형화를 수행하고,

상기 (F-2)단계는,

상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제2 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되며,

상기 (F-3)단계는,

상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 (G)단계는,

상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 상기 제1 시료 분리컬럼에서 첫번째 펩티드가 용출되기 직전의 시점이 일치되는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 제어방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치 및 그 제어 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체 내에서 특정 조건하에 발현된 모든 단백질을 총체적으로 연구하는 학문인 단백체학(프로테오믹스)에서 액체크로마토그래피 기술과 텐덤질량분석 기술을 연계한 방법(LC-MS/MS)이 매우 중요한 기술로 대두되고 있다. 대표적인 예로서 사용되는 바텀-업(bottom-up)방법은 질량분석기를 사용한 분석 이전에 단백질을 작은 단위체인 펩티드로 가수분해하여 분석한다.

[0003] 바텀-업 방법은 그 유용함이 증명되었지만 펩티드로 가수분해하는 공정은 불가피하게 시료의 복잡성을 야기한다. 예를 들어 대략 이만 개의 유전체로부터 발현된 단백질을 가수분해하였을 때 수천만 종 이상의 펩티드가 얻어진다.

[0004] 따라서 이러한 시료 복잡성을 해결하기 위한 방법으로 액체 크로마토그래피의 효율성 및 감도를 개선하여야 하는 필요성은 여전히 존재한다.

[0005] 액체 크로마토그래피-텐덤질량분석법(LC-MS/MS) 실험의 감도는 시료 분리컬럼의 길이를 일정하게 유지한 채로, 내경을 감소시키는 경우에 급격히 증가될 수 있다는 사실이 알려진 바 있다.

[0006] 그러나 종래의 액체 액체크로마토그래피 장치에서 긴 길이 및 작은 내부 직경을 갖는 모세관 컬럼을 소수성 매질로 채우는 경우에는 컬럼 평형화 또는 재생을 위해서 장시간이 소요된다는 문제점이 있다.

[0007] 이에 본 출원인은 일측 컬럼에 대해 분석 실험을 수행함과 동시에 타측 컬럼에 대한 세척과 평형화가 이뤄지는 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치를 개발하여 컬럼 평형화 동안 실험을 멈추어야 하는 휴지시간(dead time)을 최소화함으로써 실험 속도를 2배 가량 증가시킬 수 있었다.

[0008] 그러나, 기존의 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치는 하나의 밸브에 두 개의 역상 액체크로마토그래피 컬럼(이하, "시료 분리컬럼"이라 함)이 함께 연결되어 첫번째 시료 분리컬럼에서 시료 분석이 진행되는 동안 두번째 시료 분리컬럼에서는 평형화만 진행할 수 있었다. 즉 기존의 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치는 두 개의 시료 분리컬럼을 완전히 독립적으로 운영하지 못하는 문제점이 있었다.

[0009] 이로인해 기존의 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치는 첫번째 시료 분리컬럼에서 시료 분리실험을 완료한 후 밸브 스위칭을 해야만 두번째 시료 분리컬럼에 다음 시료 주입이 가능하므로, 시료 주입시간과 시료의 용출까지의 시간동안 질량분석기는 실질적으로 멈추어야 하는 휴지시간(dead time)이 발생한다는 문제점이 있었다.

[0010] 또한 시료 분리컬럼의 효율성 및 감도를 개선하기 위하여 긴 길이의 시료 분리컬럼을 사용하므로 시료가 시료 분리컬럼에서 질량분석기까지 도달하는 길이가 길어져 이로인해 시료 분리컬럼에서 첫번째 펩티드가 용출되는 동안 질량분석기에는 펩티드가 검출되지 않는 질량신호 휴지시간(mass signal dead time)이 존재한다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) [문헌1] 대한민국 공개특허 제10-2015-0112414호(2015.10.07. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 두 개의 시료 분리컬럼을 완전히 독립적으로 사용할 수 있게 하여 하나의 시료 분리컬럼에서 시료 분석이 진행되는 동안 다른 시료 분리컬럼에 대한 세척 및 평형화 과정과 시료 주입 및 등용매 용출(isocratic elution)이 가능하게 함으로써, 세척 및 컬럼평형화, 시료주입, 초기 펩티

드 용출시간에 필요한 시간을 없애고, 이를 통해 LC-MS 실험의 효율을 향상시킬 뿐 아니라, 친수성 펩티드들의 분리를 개선하고, 질량분석기의 질량신호 휴지시간을 최소화하고 역상 크로마토그래피 분리공간(separation space)을 최대화하여 펩티드 검출을 크게 개선할 수 있는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치 및 그 제어방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 측면에 따르면, 제1 용매 또는 상기 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제1 펌프; 상기 제1 용매 또는 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제2 펌프; 상기 제1 펌프와 시료를 주입하는 시료주입기가 연결된 시료 유입밸브; 제1 시료 분리컬럼이 연결되며, 상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되는 제1 고체상 추출컬럼을 구비한 제1 컬럼밸브; 제2 시료 분리컬럼이 연결되며, 상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되는 제2 고체상 추출컬럼을 구비한 제2 컬럼밸브; 및 상기 제2 펌프가 연결되되, 상기 시료 유입밸브와 상기 제1 컬럼밸브 및 상기 제2 컬럼밸브 사이에 마련되어 상기 제1 시료 분리컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼 중 어느 하나에 상기 시료 유입밸브에서 공급된 시료를 주입하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 다른 하나의 세척 및 평형화와 시료주입 및 등용매 용출(isocratic elution)이 가능하게 하는 컬럼 선택밸브를 포함하는 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치가 제공될 수 있다.

[0014] 상기 시료 유입밸브는 상기 시료주입기에 연결되는 시료 유입포트; 상기 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 시료 배출포트; 상기 제1 펌프에 연결되는 제1 펌프 연결포트; 상기 제1 펌프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 컬럼 선택밸브에 연결되는 제1 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 시료 유입포트와 상기 시료 배출포트에 연결된 상태에서 시료가 상기 시료 저장루프에 저장되고, 상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트에 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 용매와 함께 상기 컬럼 선택밸브에 공급될 수 있다.

[0015] 상기 컬럼 선택밸브는 상기 시료 유입밸브에 연결되는 제1 유입포트; 상기 제1 컬럼밸브에 연결되는 제1 컬럼밸브 연결포트; 상기 제2 컬럼밸브에 연결되는 제2 컬럼밸브 연결포트; 및 상기 제2 펌프에 연결되는 제2 펌프 연결포트를 포함하며, 상기 시료 유입밸브와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입 및 등용매 용출이 가능하게 하며, 상기 시료 유입밸브와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입 및 등용매 용출이 가능하게 할 수 있다.

[0016] 상기 제1 컬럼밸브는 상기 제1 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제1 고체상 추출컬럼 경로포트; 상기 컬럼 선택밸브에 연결되되, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 유입포트; 상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 시료 분리컬럼 연결포트; 및 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 포함하며, 상기 제2 컬럼밸브는 상기 제2 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제2 고체상 추출컬럼 경로포트; 상기 컬럼 선택밸브에 연결되되, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 유입포트; 상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 시료 분리컬럼 연결포트; 및 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제3 배출포트를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 측면에 따르면, (A) 시료 유입밸브의 시료 저장루프에 시료를 저장하고, 동시에 제1 컬럼밸브의 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼과 제2 컬럼밸브의 제2 고체상 추출컬럼 및 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계; (B) 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하며 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계; (C) 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에서 등용매 용출(isocratic elution)을 하며 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계; (D) 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에서 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화와 시료주입과 탈염 및 농축과 등용매 용출(isocratic elution)을 하는 단계; (E) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분

석을 완료함과 동시에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에서 등용매 용출을 완료하는 단계; (F) 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에서 기울기 용출하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 세척 및 평형화와 시료주입과 탈염 및 농축과 등용매 용출을 하는 단계; (G) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석을 완료함과 동시에 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼에서 등용매 용출을 완료하는 단계; 및 (H) 시료에 대한 분리 분석의 횟수 또는 시료의 개수에 따라 반복하여 상기 (D)단계 내지 상기 (G)단계를 순차로 수행하되, 상기 (D) 단계에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화 이전에 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0018] 상기 (A)단계는, (A-1) 상기 시료 유입밸브에 연결된 시료주입기에서 시료를 상기 시료 저장루프에 주입하여 저장하는 단계; (A-2) 상기 시료 유입밸브에 연결된 제1 펌프에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브를 경유하여 제1 컬럼밸브의 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계; 및 (A-3) 상기 컬럼 선택밸브에 연결된 제2 펌프에서 상기 제1 용매를 제2 컬럼밸브의 제2 고체상 추출컬럼 및 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0019] 상기 시료 유입밸브는, 상기 시료주입기에 연결되는 시료 유입포트; 상기 시료 유입포트에 인접하게 마련되는 시료 배출포트; 상기 제1 펌프에 연결되는 제1 펌프 연결포트; 상기 제1 펌프 연결포트에 인접하게 마련되며 상기 컬럼 선택밸브에 연결되는 제1 배출포트; 및 상기 시료 저장루프의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트와 제2 시료 저장루프 연결포트를 포함하며, 상기 (A-1) 단계는, 상기 제1 시료 저장루프 연결포트와 상기 제2 시료 저장루프 연결포트 각각이 상기 시료 유입포트와 상기 시료 배출포트에 연결된 상태에서 시료가 상기 시료 저장루프에 저장될 수 있다.

[0020] 상기 컬럼 선택밸브는, 상기 제1 배출포트에 연결되는 제1 유입포트; 상기 제1 컬럼밸브에 연결되는 제1 컬럼밸브 연결포트; 상기 제2 컬럼밸브에 연결되는 제2 컬럼밸브 연결포트; 및 상기 제2 펌프에 연결되는 제2 펌프 연결포트를 포함하며, 상기 (A-2) 단계는, 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행하고, 상기 (A-3) 단계는, 상기 제2 펌프 연결포트와 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 수행할 수 있다.

[0021] 상기 제1 컬럼밸브는, 상기 제1 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제1 고체상 추출컬럼 경로포트; 상기 제1 컬럼밸브 연결포트에 연결되되, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 유입포트; 상기 제1 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제1 시료 분리컬럼 연결포트; 및 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트를 포함하며, 상기 제2 컬럼밸브는, 상기 제2 고체상 추출컬럼의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 연결포트 및 제2 고체상 추출컬럼 경로포트; 상기 제2 컬럼밸브 연결포트에 연결되되, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 유입포트; 상기 제2 시료 분리컬럼에 연결되며, 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트에 연결 또는 연결해제되는 제2 시료 분리컬럼 연결포트; 및 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 인접하게 마련되어 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트에 연결 또는 연결해제되는 제3 배출포트를 포함하며, 상기 (B) 단계는, (B-1) 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제2 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되는 단계; 및 (B-2) 상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하는 단계를 포함할 수 있다.

[0022] 상기 (C) 단계는, 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 등

용매 용출할 수 있다.

[0023] 상기 (D)단계는, (D-1) 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 상기 시료 저장루프에 시료를 저장하는 단계; (D-2) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 시료 저장루프에 주입하여 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제2 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하는 단계; 및 (D-3) 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출을 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0024] 상기 (D-1)단계는, 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트를 연결하고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트를 연결한 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며, 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 제2 고체상 추출컬럼과 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 평형화를 수행하고, 상기 (D-2)단계는, 상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제3 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제2 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되며, 상기 (D-3)단계는, 상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출할 수 있다.

[0025] 상기 (H)단계에서 반복하여 상기 (D)단계 내지 상기 (G)단계를 순차로 수행하는 경우에, 상기 (D-1) 단계에서 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 평형화 이전에 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제2 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행할 수 있다.

[0026] 상기 (E) 단계는, 상기 제1 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 상기 제2 시료 분리컬럼에서 첫번째 펩티드가 용출되기 직전의 시점이 일치될 수 있다.

[0027] 상기 (F)단계는, (F-1) 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 세척을 수행한 후 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 공급하여 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 상기 시료 저장루프에 시료를 저장하는 단계; (F-2) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매를 상기 시료 저장루프에 공급하여 상기 시료 저장루프에 저장된 시료를 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축하는 단계; 및 (F-3) 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 공급하여 등용매 용출을 하는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 상기 (F-1)단계는, 상기 제2 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제2 고체상 추출컬럼 경로포트를 연결하고 상기 제2 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제2 시료 분리컬럼 연결포트를 연결한 상태에서 상기 제2 펌프에서 상기 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 상기 혼합용액을 상기 제2 고체상 추출컬럼 및 상기 제2 시료 분리컬럼에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며, 상기 제1 펌프 연결포트와 상기 제1 배출포트와 상기 제1 유입포트 및 상기 제1 컬럼밸브 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매 20%와 상기 제2 용매 80%를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 세척한 후 상기 제1 용매를 상기 제1 고체상 추출컬럼과 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 평형화를

수행하고, 상기 (F-2)단계는, 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트와 상기 제2 배출포트가 연결된 상태에서 상기 시료 저장루프에 저장된 시료가 상기 제1 펌프에서 공급되는 상기 제1 용매와 함께 상기 제1 고체상 추출컬럼에 주입되고 탈염 및 농축되며, 상기 (F-3)단계는, 상기 제1 고체상 추출컬럼 유입포트와 상기 제1 고체상 추출컬럼 경로포트가 연결되고 상기 제1 고체상 추출컬럼 연결포트와 상기 제1 시료 분리컬럼 연결포트가 연결된 상태에서 상기 제1 펌프에서 상기 제1 용매와 상기 제2 용매를 함유한 상기 혼합용액을 상기 제1 고체상 추출컬럼 및 상기 제1 시료 분리컬럼에 주입하여 등용매 용출할 수 있다.

[0029] 상기 (G)단계는, 상기 제2 시료 분리컬럼에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 상기 제1 시료 분리컬럼에서 첫번째 펩티드가 용출되기 직전의 시점이 일치될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 실시예는 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 시료 분리컬럼에 대한 세척 및 평형화를 수행하여 컬럼의 평형화를 이루는 과정 중에 질량분석기가 작동을 멈춰야하는 휴지시간의 영향이 없이 연속적으로 분석을 수행할 수 있다.

[0031] 또한 본 발명의 실시예는 제1 고체상 추출컬럼 및 제1 시료 분리컬럼과 제2 고체상 추출컬럼 및 제2 시료 분리컬럼을 6개의 포트가 있는 제1 컬럼밸브와 제2 컬럼밸브에 각각 장착함으로써, 제1 컬럼밸브의 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 컬럼밸브를 스위칭하여 제2 고체상 추출컬럼에 시료 주입을 가능케하여 시료 주입을 위해 발생되는 휴지시간의 영향없이 연속적으로 분석을 수행할 수 있으며 또한 빠른 시료 주입이 가능하여 분석효율을 극대화할 수 있다.

[0032] 또한 본 발명의 실시예는 제1 시료 분리컬럼에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 고체상 추출컬럼에 시료를 주입 후 제2 컬럼밸브를 다시 스위칭하여 제2 고체상 추출컬럼에 주입된 시료를 제2 시료 분리컬럼으로 긴 길이의 시료 분리컬럼에서 질량분석기 직전까지 시료가 도달하는데 필요한 시간만큼 등용매 용출함으로써, 제1 시료 분리컬럼에서 분리 분석이 종료되기 직전과 제2 시료 분리컬럼에서 첫번재 펩티드가 용출되는 시간을 일치시켜 제1 시료 분리컬럼에서 분리 분석이 종료됨과 동시에 제2 시료 분리컬럼에서 분리 분석이 시작되게 하여 질량분석기의 질량신호 휴지시간을 최소화하고 또한 역상 크로마토그래피 분리공간을 최대화하여 친수성 시료에 대한 분리능을 향상시킬 수 있다.

[0033] 또한 본 발명의 실시예는 전자동 스위칭 밸브로 구성되어 있으므로, 모든 실험과정을 자동화하여 실험의 재현성을 극대화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 동작을 설명하기 위한 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치에 의해 친수성 시료에 대한 분리능이 향상됨을 나타내는 그래프이다.

도 3 내지 도 11은 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 동작상태도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 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.

[0036] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시 예를 설명함으로써, 본 발명을 상세히 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조부호는 동일한 부재를 나타낸다.

[0037] 도 1은 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 동작을 설명하기 위한 그래프이고, 도 2는 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치에 의해 친수성 시료에 대한 분리능이 향상됨을 나타내는 그래프이고, 도 3 내지 도 11은 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치의 동작상태도이다.

[0038] 도 1 내지 도 11을 참조하면, 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)는, 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제1 펌프(P1)와, 제1 용매 또는 제1 용매와 제2

용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 제2 펌프(P2)와, 제1 펌프(P1)와 시료를 주입하는 시료주입기(S)가 연결된 시료 유입밸브(110)와, 제1 역상 액체크로마토그래피 컬럼(이하, "제1 시료 분리컬럼(COL1)"이라 함)이 연결되며 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 연결되는 제1 고체상 추출컬럼(Solid Phase Extraction Column: SPE1)을 구비한 제1 컬럼밸브(150)와, 제2 역상 액체크로마토그래피 컬럼(이하, "제2 시료 분리컬럼(COL2)"이라 함)이 연결되며 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 연결되는 제2 고체상 추출컬럼(Solid Phase Extraction Column: SPE2)을 구비한 제2 컬럼밸브(170)와, 시료 유입밸브(110)와 상기 제1 컬럼밸브(150) 및 제2 컬럼밸브(170)에 연결된 컬럼 선택밸브(130)를 포함한다.

[0039] 제1 펌프(P1)와 제2 펌프(P2)는 각각 제1 용매 또는 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 주입하는 펌프로서, 제1 용매는 친수성 용매로서 예를들어 0.1% 포름산 수용액을 사용할 수 있고, 제2 용매는 소수성 용매로서 예를들어 0.1% 포름산과 99.9% 아세토니트릴을 포함한 용액을 사용할 수 있다.

[0040] 시료 유입밸브(110)는 시료주입기(S)로부터 시료를 공급받아 시료 저장루프(111)에 저장한 후 제1 펌프(P1)로부터 제1 용매를 공급받아 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 컬럼 선택밸브(130)로 공급하는 역할을 한다.

[0041] 시료 유입밸브(110)는 6개의 포트를 구비한 6포트 전자동 스위칭밸브로 구성된다.

[0042] 시료 유입밸브(110)는 시료주입기(S)에 연결되는 시료 유입포트(112)와, 시료 유입포트(112)에 인접하게 마련되는 시료 배출포트(113)와, 제1 펌프(P1)에 연결되는 제1 펌프 연결포트(116)와, 제1 펌프 연결포트(116)에 인접하게 마련되며 컬럼 선택밸브(130)에 연결되는 제1 배출포트(117)와, 시료 저장루프(111)의 양단이 각각 연결되는 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115)를 포함한다.

[0043] 시료 저장루프(111)의 양단에 각각 연결된 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115)가 각각 시료 유입포트(112)와 시료 배출포트(113)에 연결된 상태에서 시료주입기(S)를 통해 시료가 시료 유입포트(112)로 공급되고 시료 저장루프(111)에 연속적으로 저장한다.

[0044] 그리고, 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115)가 각각 제1 펌프 연결포트(116)와 제1 배출포트(117)에 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)를 통해 제1 펌프 유입포트에 제1 용매를 주입하고 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 컬럼 선택밸브(130)에 연속적으로 공급한다.

[0045] 컬럼 선택밸브(130)는 시료 유입밸브(110)에서 공급되는 시료를 후술할 제1 컬럼밸브(150)에 구비되고 연결된 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)과, 제2 컬럼밸브(170)에 구비되고 연결된 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 공급하는 역할을 한다.

[0046] 또한 컬럼 선택밸브(130)는 제1 시료 분리컬럼(COL1) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2) 중 어느 하나에 시료 유입밸브(110)에서 공급된 시료를 주입하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 다른 하나에 컬럼 세척(wash) 및 평형화(equilibration)와, 시료주입 및 탈염과, 등용매 용출(isocratic elution)이 가능하게 한다.

[0047] 컬럼 선택밸브(130)는 4개의 포트를 구비한 4포트 전자동 스위칭밸브로 구성된다.

[0048] 컬럼 선택밸브(130)는 제1 배출포트(117)에 연결되는 제1 유입포트(131)와, 제1 컬럼밸브(150)에 연결되는 제1 컬럼밸브 연결포트(132)와, 제2 컬럼밸브(170)에 연결되는 제2 컬럼밸브 연결포트(133)와, 제2 펌프(P2)에 연결되는 제2 펌프 연결포트(134)를 포함한다.

[0049] 컬럼 선택밸브(130)는 제2 펌프(P2)와 제1 펌프(P1)가 연결된 시료 유입밸브(110) 각각에 연결되어, 제1 용매 또는 제1 용매와 함께 시료 또는 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액이 선택적으로 유입될 수 있다. 컬럼 선택밸브(130)에 유입된 제1 용매 또는 제1 용매와 함께 시료 또는 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액은 제1 컬럼밸브(150)로 공급되어 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)의 세척 및 평형화와 시료주입 및 탈염과 등용매 용출 및 기울기 용출(gradient elution)이 가능하게 하고 또한 제2 컬럼밸브(170)로 공급되어 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)의 세척 및 평형화와 시료주입 및 탈염과 등용매 용출 및 기울기 용출이 가능하게 한다.

[0050] 즉, 컬럼 선택밸브(130)는 제1 배출포트(117)와 제1 유입포트(131) 및 제1 컬럼밸브 연결포트(132)가 연결된 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)의 세척 및 평형화와 시료주입 및 탈염과 등용매 용출 및 기울기 용출이 가능하게 하고, 제1 배출포트(117)와 제1 유입포트(131) 및 제2 컬럼밸브 연결포트(133)가 연결된 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)의 세척 및 평형화와 시료주입 및 탈염과 등용매 용출 및 기울기 용출이 가능하게 한다.

[0051] 제1 컬럼밸브(150)는 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 시료주입 및 탈염가능하게 하고 밸브 스위칭을 통해 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입된 시료를 제1 시료 분리컬럼(COL1)으로 주입하고 등용매 용출 및 기울기 용출하여 시료를 분리 분석가능하게 한다. 또한 제2 컬럼밸브(170)는 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 시료주입 및 탈염가능하게 하고 밸브 스위칭을 통해 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입된 시료를 제2 시료 분리컬럼(COL2)으로 주입하고 등용매 용출 및 기울기 용출을 하여 시료를 분리 분석가능하게 한다.

[0052] 제1 컬럼밸브(150) 및 제2 컬럼밸브(170)는 6개의 포트를 구비한 6포트 전자동 스위칭밸브로 구성된다.

[0053] 제1 컬럼밸브(150)는 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)의 양단에 각각 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152) 및 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)와, 제1 컬럼밸브 연결포트(132)에 연결되며 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)에 선택적으로 연결되는 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와, 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 연결되며 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)에 연결 또는 연결해제되는 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)와, 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)에 인접하게 마련되어 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)에 연결 또는 연결해제되는 제2 배출포트(155)와, 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)에 인접하게 마련되며 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)와 제2 배출포트(155)에 선택적으로 연결되는 제1 컬럼 배출포트(156)를 포함한다.

[0054] 제2 컬럼밸브(170)는 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)의 양단에 각각 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172) 및 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)와, 제2 컬럼밸브 연결포트(133)에 연결되며 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)에 선택적으로 연결되는 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와, 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 연결되며 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)에 연결 또는 연결해제되는 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)와, 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)에 인접하게 마련되어 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)에 연결 또는 연결해제되는 제3 배출포트(175)와, 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)에 인접하게 마련되며 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)와 제3 배출포트(175)에 선택적으로 연결되는 제2 컬럼 배출포트(176)를 포함한다.

[0055] 본 실시예에서는 제1 시료 분리컬럼(COL1) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2) 중 어느 하나에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 다른 하나에 시료를 주입할 수 있도록 제1 컬럼밸브(150)와 제2 컬럼밸브(170)를 별개로 마련한다. 또한 본 실시예는 제1 컬럼밸브(150)와 제2 컬럼밸브(170)를 6포트 전자동 스위칭 밸브로 구성하여 종래의 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치에서 실시불가능한 제1 시료 분리컬럼(COL1) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2) 중 어느 하나에서 시료분석을 진행하는 동안 다른 하나에서 컬럼 세척 및 평형화, 시료주입, 탈염, 등용매 용출을 가능하게 한다.

[0056] 본 실시예에서는 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 세척 및 평형화를 수행하여 컬럼의 세척 및 평형화를 이루는 과정 중에 질량분석기(MS)가 작동을 멈춰야하는 휴지시간의 영향이 없이 연속적으로 분석을 수행할 수 있도록 한다. 또한 본 실시예에서는 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 시료 주입을 가능케하여 시료 주입을 위해 발생되는 휴지시간의 영향없이 연속적으로 분석으로 수행할 수 있도록 한다.

[0057] 또한 본 실시예에서는 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료를 분리 분석하는 동안 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 시료를 주입 후 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입된 시료를 제2 시료 분리컬럼(COL2)으로 등용매 용출하여 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 분리 분석이 종료됨과 동시에 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 분리 분석이 시작되게 함으로써 질량분석기(MS)의 질량신호 휴지시간을 최소화할 수 있으며 친수성 펩티드들의 분리능을 향상시킬 수 있다.

[0059] 상기와 같이 구성되는 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)를 이용하여 시료를 분리 분석하는 제어방법을 설명하면 다음과 같다.

[0061] 도 3를 참조하면, 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 먼저 초기모드의 동작을 수행한다.

[0062] 초기모드는 시료 유입밸브(110)의 시료 저장루프(111)에 시료를 저장하고, 동시에 제1 컬럼밸브(150)의 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)과 제2 컬럼밸브(170)의 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시

료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 수행한다.

[0063] 즉, 시료 유입밸브(110)에 연결된 시료주입기(S)에서 시료를 시료 저장루프(111)에 주입하여 저장한다. 이는 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 각각을 시료 유입포트(112)와 시료 배출포트(113)에 연결된 상태에서 시료주입기(S)로부터 시료를 공급받아 시료 저장루프(111)에 시료를 주입 및 저장한다.

[0064] 또한 시료 유입밸브(110)에 연결된 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브(130)를 경유하여 제1 컬럼밸브(150)의 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 평형화를 수행한다. 구체적으로 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매를 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매를 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152) 및 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 평형화를 수행한다.

[0065] 또한 컬럼 선택밸브(130)에 연결된 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 컬럼밸브(170)의 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 상기 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 수행한다. 구체적으로 제2 펌프 연결포트(134)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 수행한다.

[0067] 그리고 초기모드를 수행한 후, 도 4를 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제1 모드를 수행한다.

[0068] 제1 모드는 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입하고 탈염 및 농축하며 동시에 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0069] 즉, 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)가 연결되고 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)와 제2 배출포트(155)가 연결된 상태에서 시료 저장루프(111)에 저장된 시료가 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입되고 탈염 및 농축된다. 구체적으로 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 및 제1 배출포트(117)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 시료를 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매와 시료를 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)와 제2 배출포트(155)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입한다. 그리고 제1 용매를 예를 들어 2㎕ 정도 더 주입하여 염들이 수용성 용매인 제1 용매에 녹아 제2 배출포트(155)로 빠져나가게 하여, 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 시료를 탈염 및 농축한다.

[0070] 또한 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)가 연결되고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)가 연결된 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다. 구체적으로 제2 펌프 연결포트(134)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0072] 그리고 제1 모드를 수행한 후, 도 5를 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제2 모드를 수행한다.

[0073] 제2 모드는 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 등용매 용출(isocratic elution)을 하며 동시에 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0074] 즉, 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)가 연결되고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)와 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 등용매 용출한다. 등용매 용출에 사용되는 혼합용액은 제1 용매 90%와 제2 용매 10%를 혼합하여 사용할 수 있으나, 본 발명의 권리범위가 이에 의해 한정되는 것은 아니며 등용매 용출에 사용되는 혼합용액은 필요에 따라 제1 용매와 제2 용매의 비율을 달리할 수 있다.

[0075] 구체적으로 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152) 및 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 등용매 용출을 실시한다.

[0076] 등용매 용출에 의해 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입된 시료의 해리정도가 증가되며, 해리된 친수성 펩티드가 제1 시료 분리컬럼(COL1)으로 유입된다. 등용매 용출과정은 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 첫번째 펩티드가 질량분석기(MS) 직전까지 진행하는데 필요한 시간동안 진행된다. 따라서, 첫번째 펩티드가 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 질량분석기(MS)로 용출되기 직전에 질량분석기(MS)에 데이터 수집신호를 보내주므로 질량분석기(MS)에서 아무런 펩티드가 검출되지 않은 질량신호 휴지시간을 최소화할 수 있다. 또한 등용매 용출에 의해 도 2에서 도시한 바와 같이 친수성 펩티드들의 역상 크로마토그래피 분리공간(separation space)을 최대화할 수 있다.

[0077] 또한 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)가 연결되고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)가 연결된 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다. 구체적으로 제2 펌프 연결포트(134)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매를 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다.

[0078] 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0080] 그리고 제2 모드를 수행한 후, 도 6 내지 도 8을 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제3 모드를 수행한다.

[0081] 제3 모드는 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화와 시료주입 및 등용매 용출(isocratic elution)을 수행한다.

[0082] 즉, 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 등용매 용출이 완료되면 제2 펌프(P2)에서 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 시료 저장루프(111)에 시료를 저장한다.

[0083] 구체적으로, 도 6에서 도시한 바와 같이, 제2 펌프 연결포트(134)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)

를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)와 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 기울기 용출하여 시료를 분리 분석한다. 도 1에서 도시한 바와 같이, 기울기 용출은 제2 펌프(P2)를 이용하여 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액 중의 제1 용매와 제2 용매의 비율을 시간 경과에 따라 변화시켜가며 수행된다. 즉, 혼합용액의 초기조건은 등용매 용출 조건과 동일하게 제1 용매 90%와 제2 용매 10%에서 시작하며, 혼합용액의 제2 용매 비율이 증가할 수록 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입된 시료의 해리정도가 증가하여 시료가 제1 시료 분리컬럼(COL1)으로 유입되고, 이후 시료의 분리를 통해 분석이 이뤄진다. 한편, 기울기 용출에 사용되는 혼합용액의 조성은 등용매 용출 조건에 따라 변경가능하다.

[0084] 또한 제1 펌프 연결포트(116)와 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매를 제1 유입포트(131)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매를 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0085] 또한 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 각각을 시료 유입포트(112)와 시료 배출포트(113)에 연결된 상태에서 시료주입기(S)로부터 시료를 공급받아 시료 저장루프(111)에 시료를 주입 및 저장한다.

[0086] 그리고 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 시료 저장루프(111)에 주입하여 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입하고 탈염 및 농축한다.

[0087] 즉, 도 7에서 도시한 바와 같이 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)가 연결되고 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)와 제3 배출포트(175)가 연결된 상태에서 시료 저장루프(111)에 저장된 시료가 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입되고 탈염 및 농축된다. 구체적으로, 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 및 제1 배출포트(117)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 시료를 제1 유입포트(131)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매와 시료를 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)와 제3 배출포트(175)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입한다. 그리고 제1 용매를 예를 들어 2㎕ 정도 더 주입하여 염들이 수용성 용매인 제1 용매에 녹아 제3 배출포트(175)로 빠져나가게 하여, 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 시료를 탈염 및 농축한다.

[0088] 그리고 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 등용매 용출을 한다.

[0089] 구체적으로, 도 8에서 도시한 바와 같이, 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 유입포트(131)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172) 및 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 등용매 용출을 실시한다.

[0091] 그리고 제3 모드를 수행한 후, 도 8을 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제4 모드를 수행한다.

[0092] 제4 모드는 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료에 대한 분리 분석을 완료함과 동시에 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 등용매 용출을 완료한다.

[0093] 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 첫번째

펩티드가 용출되기 직전의 시점을 일치시켜 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 분리 분석이 종료됨과 동시에 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 분리 분석이 시작되게 함으로써, 질량분석기(MS)의 질량신호 휴지시간을 최소화할 수 있다.

[0095] 그리고 제4 모드를 수행한 후, 도 9를 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제5 모드를 수행한다.

[0096] 제5 모드는 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 기울기 용출하여 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 세척 및 평형화와 시료주입 및 등용매 용출을 한다.

[0097] 즉, 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 등용매 용출이 완료되면 제2 펌프(P2)에서 제2 용매를 시간 경과에 따라 증가시킨 혼합용액을 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 공급하여 기울기 용출(gradient elution)하여 시료를 분리 분석하며 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 공급하여 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 평형화를 지속적으로 수행하고 시료 저장루프(111)에 시료를 저장한다. 한편, 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 평형화 이전에 제1 용매 20%와 제2 용매 80%를 함유한 혼합용액을 사용하여 짧은 시간 동안 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 세척과정을 수행할 수 있으며, 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 세척과정은 복수 번 반복하여 실시할 수 있다(도 1 참조).

[0098] 구체적으로, 도 9에서 도시한 바와 같이, 제2 펌프 연결포트(134)와 제2 컬럼밸브 연결포트(133)를 연결한 상태에서 제2 펌프(P2)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제2 컬럼밸브(170)로 공급한다. 그리고 제2 컬럼밸브(170)에 공급된 혼합용액을 제2 고체상 추출컬럼 유입포트(171)와 제2 고체상 추출컬럼 경로포트(173)를 연결하고 제2 고체상 추출컬럼 연결포트(172)와 제2 시료 분리컬럼 연결포트(174)를 연결한 상태에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 주입하여 기울기 용출하여 시료를 분리 분석한다. 도 1에서 도시한 바와 같이, 기울기 용출은 제2 펌프(P2)를 이용하여 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액 중의 제1 용매와 제2 용매의 비율을 시간 경과에 따라 변화시켜가며 수행된다. 즉, 혼합용액의 초기조건은 등용매 용출 조건과 동일하게 제1 용매 90%와 제2 용매 10%에서 시작하며, 혼합용액의 제2 용매 비율이 증가할 수록 제2 고체상 추출컬럼(SPE2)에 주입된 시료의 해리정도가 증가하여 시료가 제2 시료 분리컬럼(COL2)으로 유입되고, 이후 시료의 분리를 통해 분석이 이뤄진다. 한편, 기울기 용출에 사용되는 혼합용액의 조성은 등용매 용출 조건에 따라 변경가능하다.

[0099] 또한 제1 펌프 연결포트(116)와 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매를 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매를 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)와 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)과 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 대한 평형화를 지속적으로 수행한다.

[0100] 또한 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 각각을 시료 유입포트(112)와 시료 배출포트(113)에 연결된 상태에서 시료주입기(S)로부터 시료를 공급받아 시료 저장루프(111)에 시료를 주입 및 저장한다.

[0101] 그리고 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매를 시료 저장루프(111)에 공급하여 시료 저장루프(111)에 저장된 시료를 제1 고체상 추출컬럼에 주입하고 탈염 및 농축한다.

[0102] 즉, 도 10에서 도시한 바와 같이, 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)가 연결되고 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)와 제2 배출포트(155)가 연결된 상태에서 시료 저장루프(111)에 저장된 시료가 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입되고 탈염 및 농축된다. 구체적으로 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 시료 저장루프 연결포트(114)와 제2 시료 저장루프 연결포트(115) 및 제1 배출포트(117)가 연결된 상태에서 제1 펌프(P1)에서 공급되는 제1 용매와 함께 시료 저장루프

(111)에 저장된 시료를 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 시료를 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매와 시료를 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)와 제2 배출포트(155)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 주입한다. 그리고 제1 용매를 예를 들어 2㎕ 정도 더 주입하여 염들이 수용성 용매인 제1 용매에 녹아 제2 배출포트(155)로 빠져나가게 하여, 제1 고체상 추출컬럼(SPE1)에 시료를 탈염 및 농축한다.

[0103] 그리고 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 시료를 분리 분석하는 동안 동시에 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 등용매 용출을 한다.

[0104] 구체적으로, 도 11에서 도시한 바와 같이, 제1 펌프 연결포트(116) 및 제1 배출포트(117)를 연결한 상태에서 제1 펌프(P1)에서 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 컬럼 선택밸브(130)로 공급한다. 그리고 컬럼 선택밸브(130)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 유입포트(131)와 제1 컬럼밸브 연결포트(132)를 연결한 상태에서 제1 컬럼밸브(150)로 공급한다. 그리고 제1 컬럼밸브(150)에 공급된 제1 용매와 제2 용매를 함유한 혼합용액을 제1 고체상 추출컬럼 유입포트(151)와 제1 고체상 추출컬럼 경로포트(153)를 연결하고 제1 고체상 추출컬럼 연결포트(152) 및 제1 시료 분리컬럼 연결포트(154)를 연결한 상태에서 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에 주입하여 등용매 용출을 실시한다.

[0106] 그리고 제5 모드를 수행한 후, 도 11을 참조하면 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 제6 모드를 수행한다.

[0107] 제6 모드는 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 시료에 대한 분리 분석을 완료함과 동시에 제1 고체상 추출컬럼(SPE1) 및 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 등용매 용출을 완료한다.

[0108] 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 시료에 대한 분리 분석이 종료되는 시점과 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 첫번째 펩티드가 용출되기 직전의 시점을 일치시켜 제2 시료 분리컬럼(COL2)에서 분리 분석이 종료됨과 동시에 제1 시료 분리컬럼(COL1)에서 분리 분석이 시작되게 함으로써, 질량분석기(MS)의 질량신호 휴지시간을 최소화할 수 있다.

[0110] 그리고 제6 모드를 수행한 후, 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 시료에 대한 분리 분석의 횟수 또는 시료의 개수에 따라 반복하여 제3 모드부터 제6 모드를 순차로 수행할 수 있다.

[0111] 이때 제3 모드에서 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 평형화 이전에 제1 용매 20%와 제2 용매 80%를 함유한 혼합용액을 사용하여 짧은 시간 동안 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 세척과정을 추가로 수행할 수 있으며, 제2 고체상 추출컬럼(SPE2) 및 제2 시료 분리컬럼(COL2)에 대한 세척과정은 복수 번 반복하여 실시할 수 있다(도 1 및 도 6 참조).

[0112] 전술한 바와 같이, 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 시료에 대한 분리 분석의 횟수 또는 시료의 개수에 따라 제3 모드부터 제6 모드를 반복할 수 있으므로, 휴지시간의 영향없이 분리 분석의 효율성을 향상시킬 수 있다.

[0113] 또한 본 발명에 따른 상호 독립적 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치(100)의 제어방법은 등용매 용출 과정을 추가하여 질량분석기(MS)에 펩티드가 검출되지 않는 질량신호 휴지시간을 최소화할 뿐만 아니라 친수성 펩티드들의 분리능을 향상시킬 수 있다.

[0115] 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

[0116] 100: 이중 온라인 액체크로마토그래피 장치 110: 시료 유입밸브

111: 시료 저장루프 112: 시료 유입포트

113: 시료 배출포트 114: 제1 시료 저장루프 연결포트

115: 제2 시료 저장루프 연결포트 116: 제1 펌프 연결포트

117: 제1 배출포트 130: 컬럼 선택밸브

131: 제1 유입포트 132: 제1 컬럼밸브 연결포트

133: 제2 컬럼밸브 연결포트 134: 제2 펌프 연결포트

150: 제1 컬럼밸브 COL1: 제1 시료 분리컬럼

SPE1: 제1 고체상 추출컬럼 151: 제1 고체상 추출컬럼 유입포트

152: 제1 고체상 추출컬럼 연결포트 153: 제1 고체상 추출컬럼 경로포트

154: 제1 시료 분리컬럼 연결포트 155: 제2 배출포트

156: 제1 컬럼 배출포트 170: 제2 컬럼밸브

COL2: 제2 시료 분리컬럼 SPE2: 제2 고체상 추출컬럼,

171: 제2 고체상 추출컬럼 유입포트 172: 제2 고체상 추출컬럼 연결포트

173: 제2 고체상 추출컬럼 경로포트 174: 제2 시료 분리컬럼 연결포트

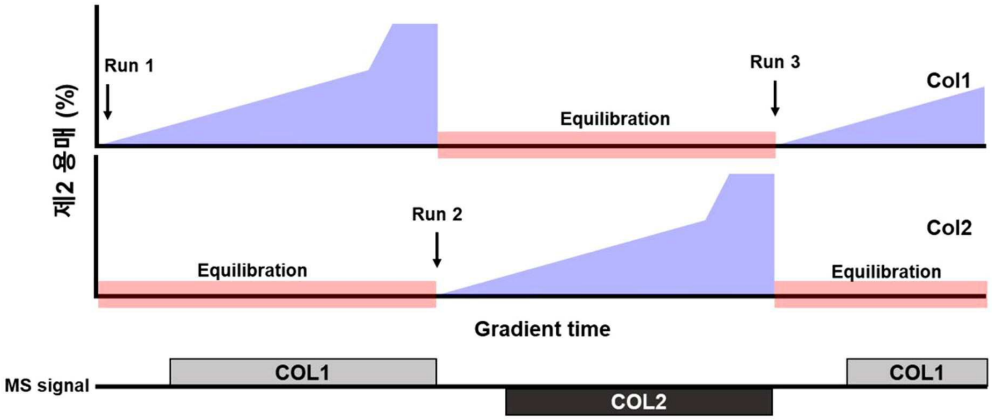
175: 제3 배출포트 176: 제2 컬럼 배출포트

P1: 제1 펌프 P2: 제2 펌프 S: 시료주입기

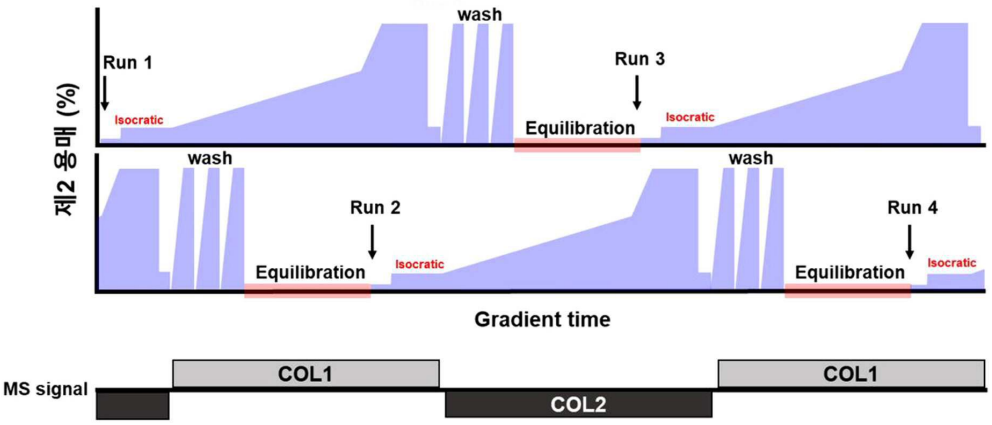
도면

도면1

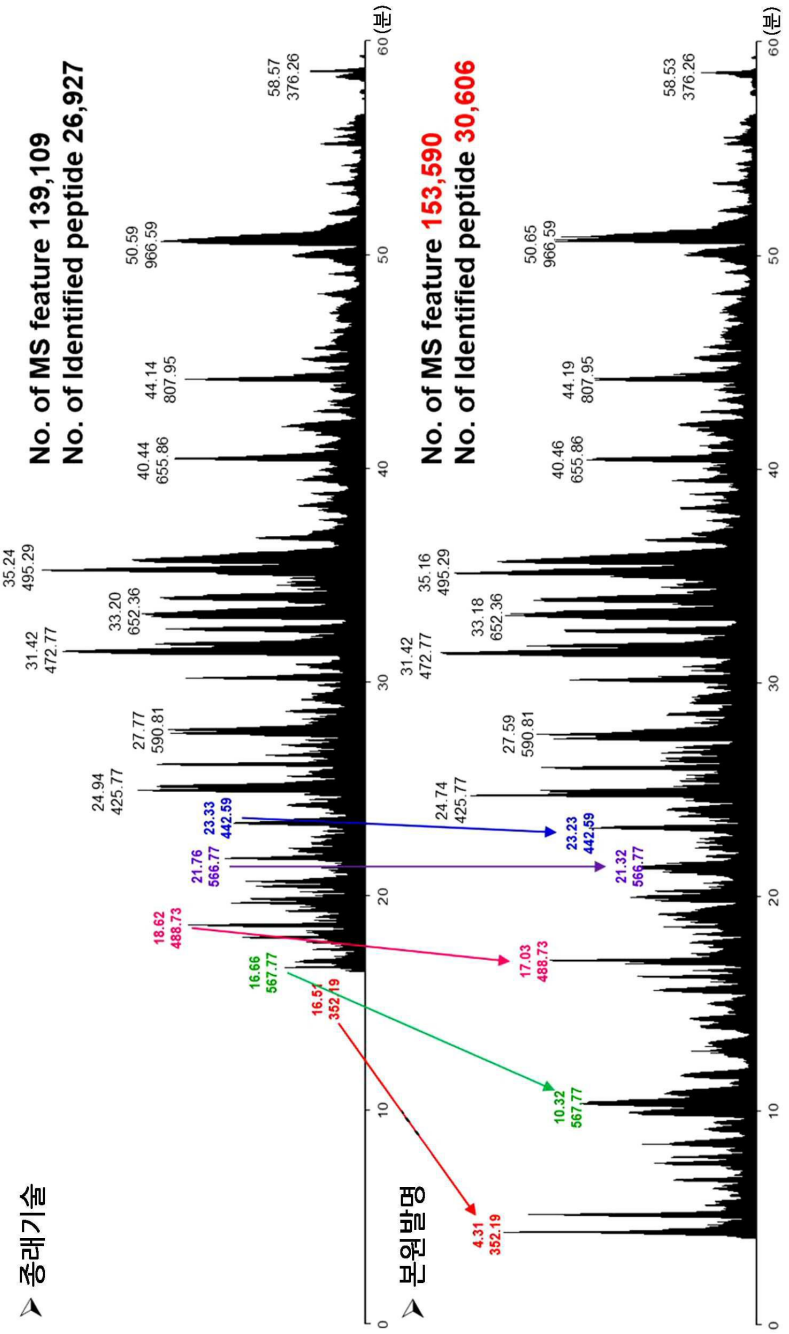
➢ 종래기술



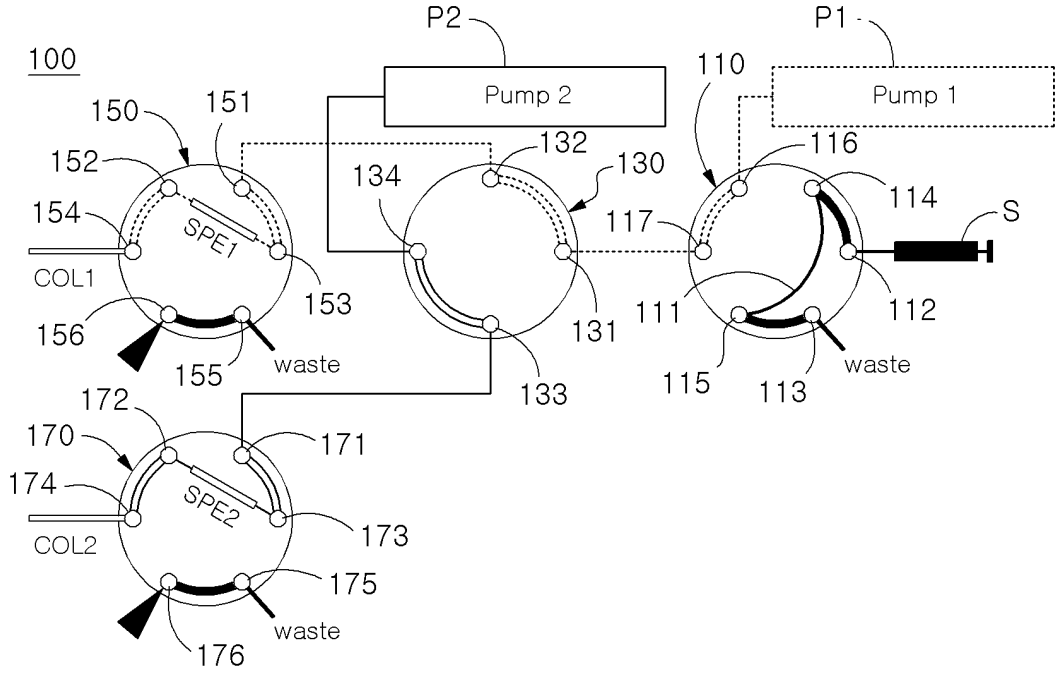
➢ 본원발명



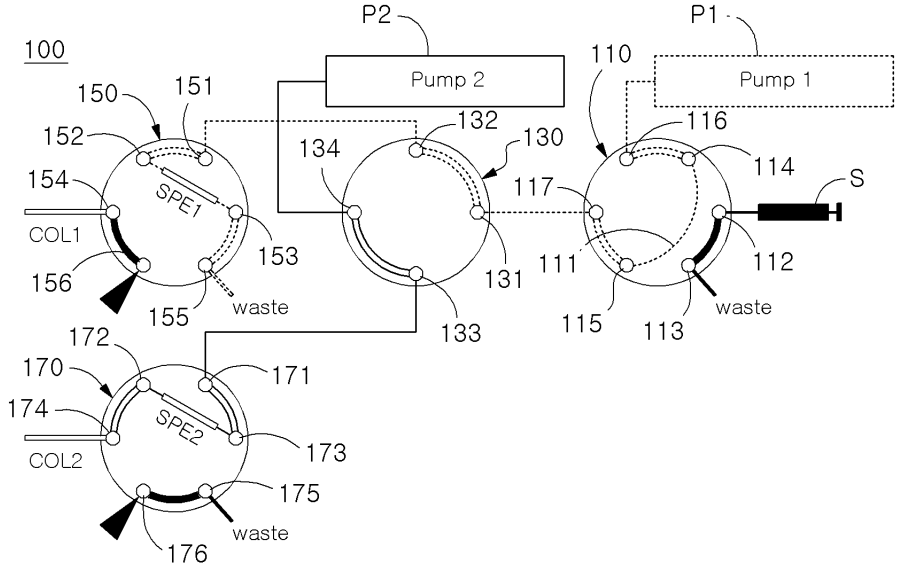
도면2


종래기술
No. of MS feature 139,109
No. of Identified peptide 26,927
35.24
495.29
31.42
472.77
33.20
652.36
27.77
590.81
24.94
425.77
40.44
655.86
44.14
807.95
50.59
966.59
58.57
376.26
23.33
442.59
21.76
566.77
18.62
488.73
16.66
567.77
16.51
352.19
4.31
352.19
10.32
567.77
본원발명
No. of MS feature 153,590
No. of Identified peptide 30,606
35.16
495.29
31.42
472.77
33.18
652.36
27.59
590.81
24.74
425.77
40.46
655.86
44.19
807.95
50.65
966.59
58.53
376.26
23.23
442.59
21.32
566.77
17.03
488.73
0
10
20
30
40
50
60 (분)

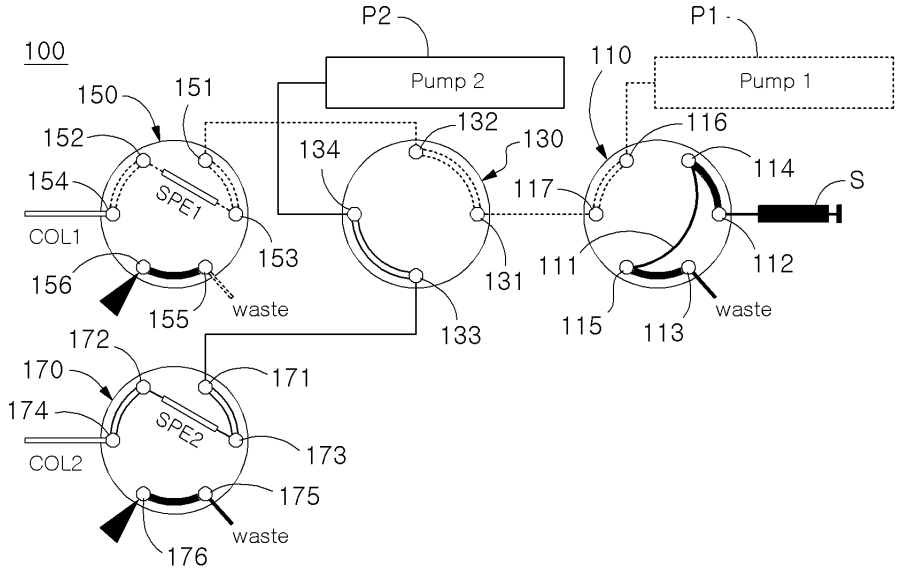
도면3


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
110
150
151
152
132
130
134
116
114
S
154
SPE1
117
COL1
153
111
112
156
131
155
waste
115
113
waste
133
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

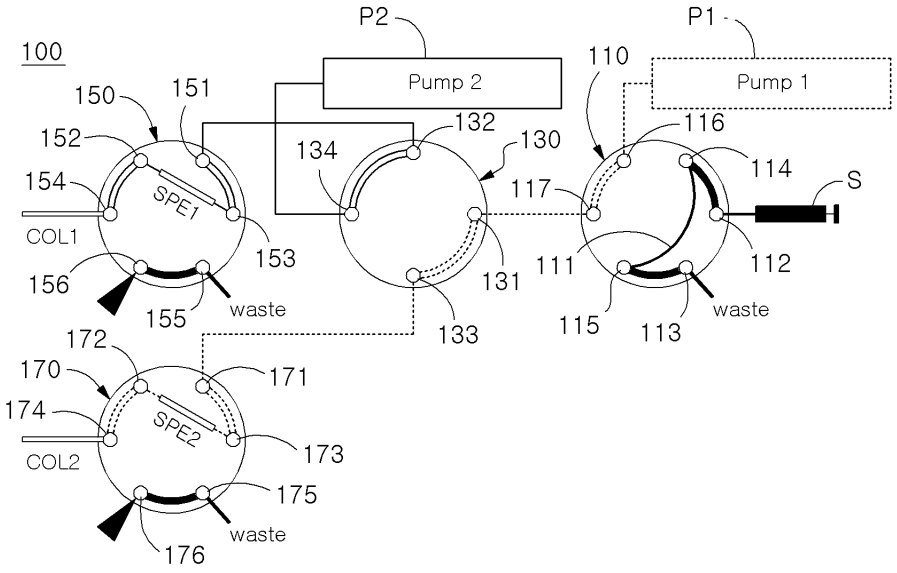
도면4


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
110
150
151
152
132
130
134
116
114
S
154
SPE1
117
COL1
153
111
112
156
131
155
waste
115
113
waste
133
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

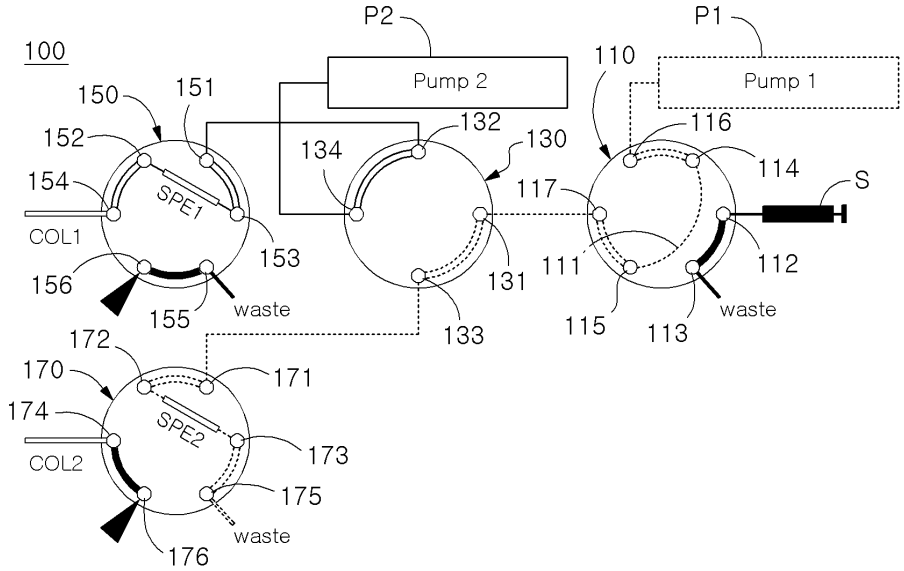
도면5


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
110
150
151
152
132
134
130
116
114
S
154
SPE1
117
COL1
153
156
131
111
112
155
waste
115
113
waste
133
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

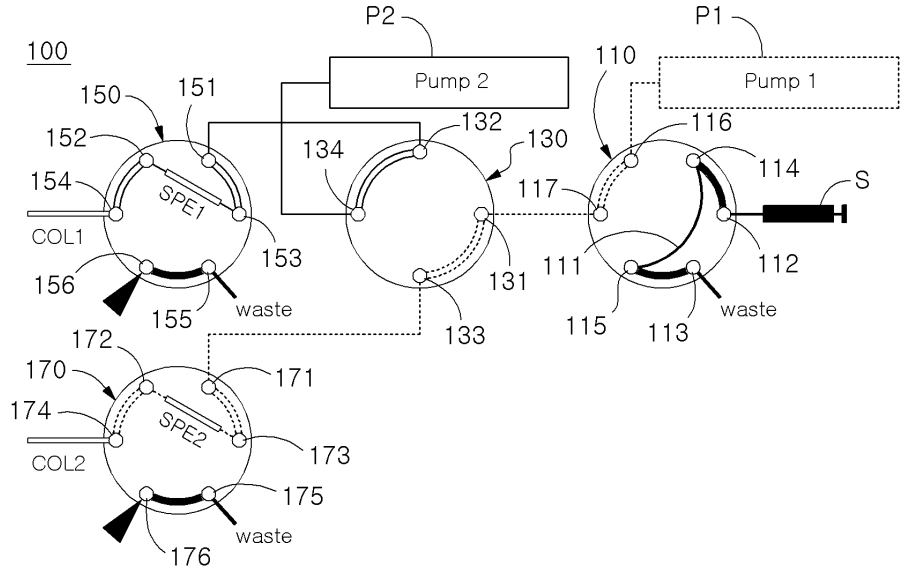
도면6


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
110
150
151
152
132
134
130
116
114
S
154
SPE1
117
COL1
153
156
131
111
112
155
waste
115
113
waste
133
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

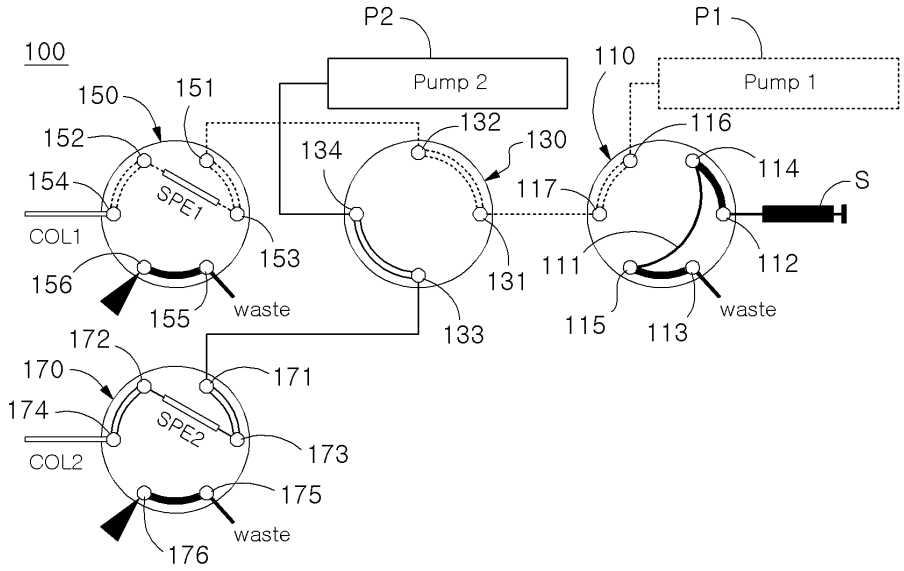
도면7


100
P2
Pump 2
P1
Pump 1
110
150
151
152
154
SPE1
COL1
153
156
155
waste
132
134
130
117
131
133
116
114
S
111
112
115
113
waste
172
170
171
174
SPE2
COL2
173
175
176
waste

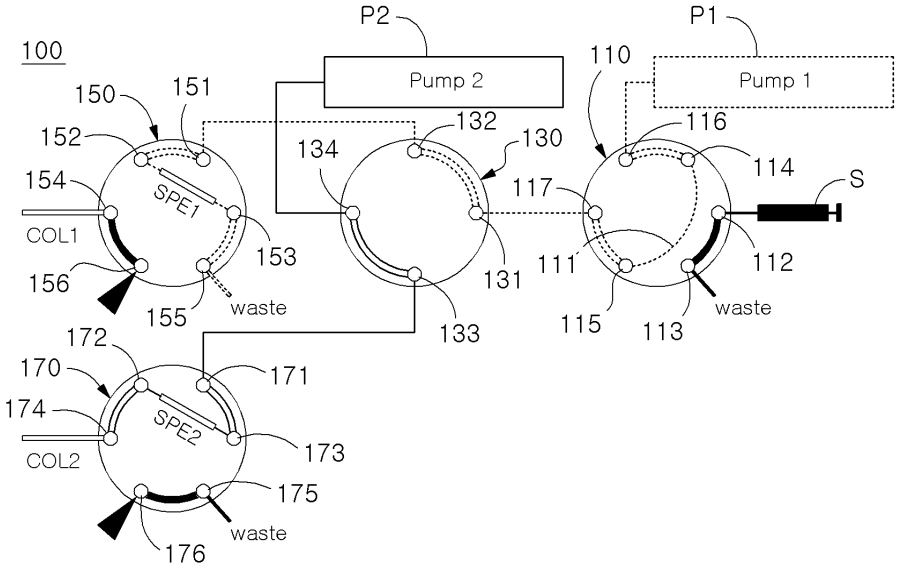
도면8


100
P2
Pump 2
P1
Pump 1
110
150
151
152
154
SPE1
COL1
153
156
155
waste
132
134
130
117
131
133
116
114
S
111
112
115
113
waste
172
170
171
174
SPE2
COL2
173
175
176
waste

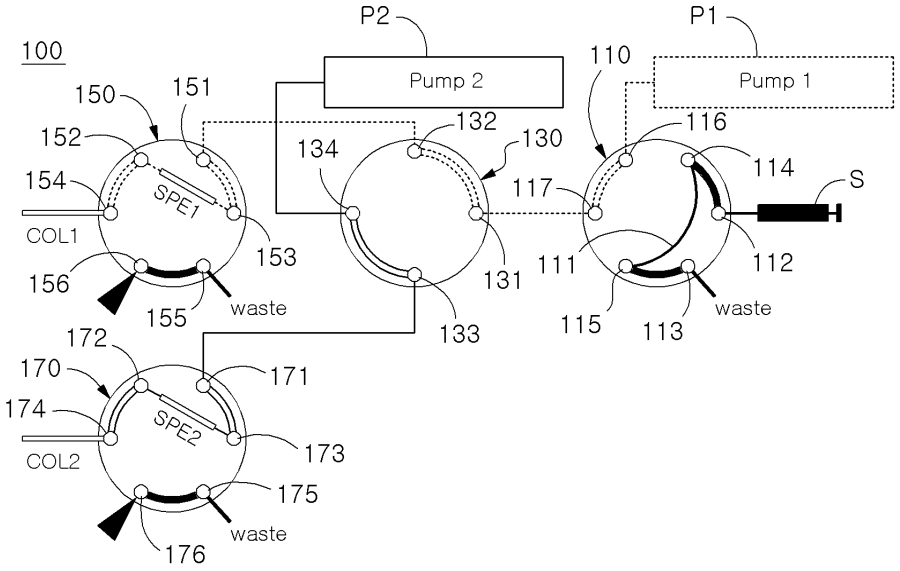
도면9


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
150
151
110
152
132
116
134
130
154
SPE1
114
S
117
COL1
153
131
111
112
156
155
waste
133
115
113
waste
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

도면10


P2
P1
100
Pump 2
Pump 1
150
151
110
152
132
116
134
130
154
SPE1
114
S
117
COL1
153
131
111
112
156
155
waste
133
115
113
waste
172
170
171
174
SPE2
173
COL2
175
waste
176

도면11


100
P2
Pump 2
P1
Pump 1
110
150
151
152
154
SPE1
COL1
153
156
155
waste
132
134
130
117
131
133
116
114
S
111
112
115
113
waste
172
170
171
174
SPE2
COL2
173
175
176
waste