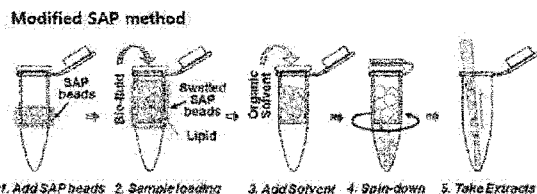
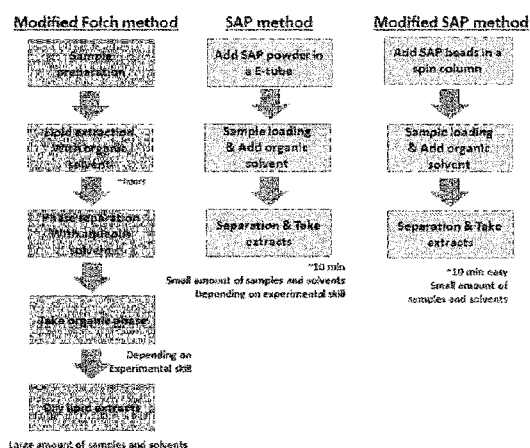




- (51) 국제특허분류: *G01N 1/38* (2006.01) *G01N 33/487* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/000712
- (22) 국제출원일: 2019년 1월 17일 (17.01.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2018-0109563 2018년 9월 13일 (13.09.2018) KR
- (71) 출원인: 한국기초과학지원연구원 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE) [KR/KR]; 34133 대전시 유성구 과학로 169-148, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김영환 (KIM, Young Hwan); 34090 대전시 유성구 은구비남로 34, 814동 1601호, Daejeon (KR). 방글 (BANG, Geul); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청6길 19-15, Chungcheongbuk-do (KR). 김정아 (KIM, Jeong Ah); 34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 102동 202호, Daejeon (KR). 최정훈 (CHOI, Jung Hoon); 28116 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청5길 76-28, 101호, Chungcheongbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 김태선 (KIM, Tae Sun); 06779 서울시 서초구 강남대로16길 3, 8층, 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: LIPID EXTRACTION METHOD USING SPIN COLUMN FILLED WITH SUPER ABSORBENT POLYMER BEADS

(54) 발명의 명칭: 고흡수성 수지 비드로 채워진 스핀 컬럼을 이용한 지질체의 추출방법



(57) Abstract: The present invention relates to a lipid extraction method using a spin column filled with super absorbent polymer beads (SAPBs) and a lipid extraction kit using the super absorbent polymer beads. The lipid extraction method according to the present invention has excellent sensitivity, reproducibility, and quantitative accuracy compared with conventional Folch methods and SAP methods.

(57) 요약서: 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀 컬럼을 이용한 지질체의 추출방법 및 상기 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 지질체의 추출 방법은 종래 Folch 방법 및 SAP 방법에 비해 민감도, 재현성 그리고 고정량성이 우수한 장점이 있다.

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예
외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 고흡수성 수지 비드로 채워진 스핀 컬럼을 이용한 지질체의 추출방법

기술분야

- [1] 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀 컬럼을 이용한 지질체의 추출방법 및 상기 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 지질은 생물 세포막의 주요 성분으로서 다수의 생화학적 기능 및 세포 내 세포 신호, 분비, 에너지 저장과 같은 대사 과정에 관여한다. 또한, 지질은 생물학적 메커니즘에서 중요한 역할을 하고 당뇨병, 알츠하이머병, 동맥경화, 및 암과 같은 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 이로 인해 생분석 화학 분야에서 지질에 대한 광범위하고 정량적인 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 시료의 분석에서 가장 중요한 이슈는 시료 처리 공정에 따른 시료의 손실에 있다. 이를 극복하기 위하여, 시료 준비 과정에서 시료 전달 및 손실 부피를 감소시키기 위한 방법이 개발되고 있다. 또한, 지질의 극성과 분자 골격 구조에 따라 지질의 종류가 다양하기 때문에 높은 회수율로 모든 종류의 지질에 대한 동시 분석을 복잡하게 만든다. 고도로 정교한 지질 분석 방법에도 불구하고, 성공적인 분석은 세포, 조직, 및 체액과 같은 생체 시료로부터의 복잡한 지질 혼합물의 효율적인 추출 및 분리 방법에 의해 결정된다.

[4]

- [5] 전통적인 지질 추출 방법으로는 액체-액체 추출 (liquid-liquid extraction, LLE) 방법을 기반으로 하는 Folch(혹은 modified Folch) method 또는 Bligh/Dyer method 방법이 존재한다. 일반적으로, 상기 LLE 방법은 적은 양의 시료 분석에는 적합하지 않으며 지질 추출에 오랜 시간이 걸리며 또한 낮은 회수율을 보인다. 특히, 혈장, 소변 또는 체액과 같은 생체액 시료로부터 지질을 추출하여 분석할 경우에는 수분의 제거가 전제조건이다. 한편, 특허 제10-1816288호는 고흡수성 수지를 이용한 시료의 전처리 방법 및 이를 위한 디바이스 (이하 “SAP” 방법이라고도 함)에 관한 것으로, 고흡수성 수지 파우더를 이용하고 원심분리 단계를 요구함이 없이 지질추출의 간소화된 방법을 개시하고 있으나, 일반적인 에펜도르프 튜브에서 원심분리 없이 분리하여 정량적으로 유기층을 분리하는데 한계가 있으며, 편리성, 재현성 그리고 정량성이 떨어지는 문제가 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 이에 본 발명자들은 지질체를 추출하기 위해 사용된 기존 Folch 및 SAP 방법의 절차를 개선하고 분리 효율을 증대시키기 위하여 연구하던 중, 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀 컬럼을 이용하여 시료 내 수용액을 SAPB와의 교화를 거친 후 유기용매를 첨가하여 녹여진 지질체를 원심분리하는 경우 높은 민감도, 재현성 그리고 정량성으로 지질체를 분리할 수 있음을 확인하고 본 발명(Modified SAP method)을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀 컬럼을 이용한 지질체의 추출방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [10] 본 발명은 또한 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)를 이용한 지질체 추출 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 명세서에서 사용된 용어 “고흡수성 수지(Super Absorbent Polymer, SAP)”는 자체 무게의 최대 5백 내지 1천 배 정도의 수분을 흡수할 수 있는 기능을 가진 합성 고분자 물질을 의미한다.
- [12] 본 명세서에서 사용된 용어 “시료(sample)”는 분석물을 포함하는 분석대상 화합물 또는 조성물을 가리키며, 본 발명에서 사용될 수 있는 시료는 수용액상 또는 수용액을 포함한 유사한 유동성 있는 물질이다. 상기 시료는 생물학적 시료로, 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 분뇨, 림프액, 양수 등의 생체 유래 체성분을 포함하며, 그 밖에 조직, 세포 및 미생물로부터 추출된 액체를 포함하는 유동성 있는 물질을 의미한다.
- [13] 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용하여 지질을 추출하는 원리를 도 1에 나타내었다. 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀 컬럼을 이용하여 시료 내 수용액을 SAPB와의 교화를 거쳐 첨가된 유기용매에 녹여진 지질체를 원심분리를 통해 분리함으로써, 종래 modified Folch 방법 및 SAP 방법에 비해 적은 양(예를 들면, 혈장의 경우 10 μ L 이하)의 시료도 신속하고 높은 민감도 및 재현성으로 추출할 수 있다.

[14]

발명의 효과

- [15] 본 발명의 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체의 추출 방법에 따르면 고흡수성 수지 비드를 이용하여 종래 Folch 방법에 비해 빠른 시간 동안 적은 양의 시료로부터 지질체의 추출이 가능하고, 또한 종래 SAP 방법에 비해 재현성, 민감도 그리고 정량성이 우수한 장점이 있다. 따라서, 본 발명은 질환 진단에 필요한 생체액내 질환 관련 바이오마커들을 추출 및 농축할 수 있는 시료전처리 진단 키트 개발 등의 의생물 및 화학분야의 산업적 이용 가능성이 매우 높은 것으로 기대된다.

[16]

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용하여 지질을 추출하는 원리를 나타낸다.
- [18] 도 2는 실시예 1과 3의 추출 방법에 따른 회수시험(recovery test) 결과를 나타낸다
- [19] 도 3은 실시예 1 내지 3의 추출 방법에 따른 양이온 모드에서 민감도 및 정량성 비교 결과를 나타낸다.
- [20] 도 4는 실시예 1 내지 3의 추출 방법에 따른 음이온 모드에서 민감도 및 정량성을 비교 결과를 나타낸다.
- [21] 도 5는 실시예 1 내지 3의 추출 방법에 따른 양이온 모드에서 재현성 비교 결과를 나타낸다.
- [22] 도 6는 실시예 1 내지 3의 추출 방법에 따른 음이온 모드에서 재현성 비교 결과를 나타낸다.

[23]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [24] 제1구현예에 따르면,
- [25] 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스피ن-컬럼을 이용한 지질체의 추출방법을 제공하고자 하는 것으로, 상기 방법은:
- [26] (A) 수용성 시료를 고흡수성 수지 비드로 채워진 스피ن-컬럼에 첨가하여 혼합 흡수 시키는 단계;
- [27] (B) 상기 고흡수성 수지 비드에 유기용매를 첨가하여 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지 비드에 흡수되는 수용액 층과 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기용매 액체층이 고체화된 수용액 층과 분리되는 단계; 및
- [28] (C) 상기 고흡수성 수지 비드를 포함하는 수용액층으로부터 원심분리하여 지질체를 포함한 유기용매층을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [29] 본 발명에 따른 지질체의 추출 방법에 있어서, 상기 비드의 평균 직경은 1.5 mm 이하 인 것을 특징으로 한다.
- [30] 본 발명에 따른 지질체의 추출 방법에 있어서, 상기 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 분뇨, 림프액, 양수, 조직, 세포 및 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [31] 본 발명에 따른 지질체의 추출 방법에 있어서, 상기 유기용매는 알킬 에테르(예를 들면, 디이소프로필 에테르, 메틸 t-부틸에테르(MTBE), 에틸 t-부틸 에테르, 메틸 t-펜틸 에테르(TAME), 에틸 t-펜틸 에테르, 테트라히드로푸란(THF), 1,4-디옥산, 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르 또는 디에틸 에테르, 디에틸렌 글리콜 디메틸 에테르 또는 디에틸 에테르); 디알킬 케톤(예를 들면, 메틸 에틸 케톤, 메틸 i-프로필 케톤 또는 메틸 i-부틸 케톤, 니트릴(예를

들면, 아세토니트릴, 프로피오니트릴, 부틸로니트릴 또는 벤조니트릴);
 아미드(예를 들면, N,N-디메틸-포름아미드(DMF), N,N-디메틸-아세트아미드,
 N-메틸-포름아닐리드, N-메틸-피롤리돈 또는 헥사메틸-포스포르아미드);
 에스테르(예를 들면, 메틸, 에틸, n- 또는 i-프로필, n-, i- 또는 s-부틸 아세테이트);
 알콜(예를 들면, 에탄올, n- 또는 i-프로판올, n-, i-, s- 또는 t-부탄올) 및
 술폭사이드로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 한다.

- [32] 본 발명에 따른 지질체의 추출 방법에 있어서, 상기 방법은: (A) 수용성 시료를
 고흡수성 수지 비드로 채워진 스핀-컬럼에 첨가하여 혼합 흡수 시키는 단계; (B)
 상기 고흡수성 수지 비드에 MeOH 및 MTBE(methyl tert-butyl ether)를 첨가하여
 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지 비드에 흡수되는 수용액 층과
 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기용매 액체층이
 고체화된 수용액 층과 분리되는 단계; 및 (C) 상기 고흡수성 수지 비드를
 포함하는 수용액층으로부터 6,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 지질체를
 포함하는 유기용매층을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[33]

- [34] 제2구현예에 따르면,

- [35] 본 발명은 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)를 이용한
 지질체 추출 키트를 제공하고자 하는 것으로, 상기 키트는

- [36] (a) 수용성 시료와 유기용매가 유입되는 유입부;

- [37] (b) 수용성 시료를 혼합 흡수하기 위한 고흡수성 수지 비드를 포함하는 수용부;
 및

- [38] (c) 상기 수용부 내의 수용성 시료, 유기용매 및 고흡수성 수지 비드
 혼합물로부터 원심분리된 지질체가 배출되는 배출부를 포함하고,

- [39] 상기 수용부 내의 수용성 시료가 혼합 흡수된 고흡수성 수지 비드에
 유기용매가 첨가되면 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지에 흡수되는
 수용액 층과 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기용매
 액체층이 고체화된 수용액 층과 분리되는 것을 특징으로 한다.

- [40] 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 있어서, 상기
 키트는 상기 수용부와 상기 배출부 사이에 마련되어 원심분리되는 상기
 지질체를 여과하는 필터부를 더욱 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 필터부는
 분리막(membrane) 또는 여과제(media filter)로 이루어질 수 있다.

- [41] 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 있어서, 상기
 비드의 평균 직경은 1.5 mm 이하 인 것을 특징으로 한다.

- [42] 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 있어서, 상기
 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 분뇨, 림프액, 양수, 조직, 세포 및 미생물로
 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.

- [43] 본 발명에 따른 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트에 있어서, 상기
 유기용매는 알킬 에테르, 디알킬 케톤, 아미드, 에스테르, 알콜 및 술폭사이드로

이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 한다.

[44]

발명의 실시를 위한 형태

[45] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] <실시예>

[48] 실시예 1. Folch 방법에 따른 지질체 추출

[49] 혈장을 에펜도르프(Eppendorf) 튜브에 넣고 200 μ L의 MeOH 및 600 μ L의 MTBE를 연속적으로 첨가하였다. 30분 동안 볼텍싱 이후에, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 수행하였다. 상층액을 수거하여 새로운 에펜도르프 튜브에 옮긴 후, 200 μ L의 DW를 첨가하였다. 그 다음, 30분 동안 볼텍싱 이후에, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 수행하였다. 상층액을 수거하여 새로운 에펜도르프 튜브에 옮기고 질소 가스를 이용하여 건조시켰다.

[50]

[51] 실시예 2. SAP 방법에 따른 지질체 추출

[52] LG Chemicals, Inc.으로부터 구입한 고흡수성 수지 분말 2-15mg을 에펜도르프 튜브에 넣고, 혈장 시료를 첨가하였다. 상기 고흡수성 수지 분말이 충분히 swelling된 후, 100 μ L의 MeOH 및 200 μ L의 MTBE를 연속적으로 첨가하였다. 5분 동안 볼텍싱 이후에, 13,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 수행하였다. 상층액을 수거하여 새로운 에펜도르프 튜브에 옮기고 질소 가스를 이용하여 건조시켰다.

[53]

[54] 실시예 3. 본 발명 (modified SAP)에 따른 지질체 추출

[55] 15개의 고흡수성 수지 비드를 spin column의 reservoir에 넣고, 혈장 시료를 첨가하였다. 상기 고흡수성 수지 비드가 충분히 swelling된 후, 100 μ L의 MeOH 및 200 μ L의 MTBE를 연속적으로 첨가하였다. 그 다음, 6,000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 수행하였다. spin down된 용매(유기층)를 새로운 에펜도르프 튜브에 옮기고 질소 가스를 이용하여 건조시켰다.

[56]

[57] <실험예>

[58] 실험예 1. 추출 방법에 따른 회수시험 결과 비교

[59] 상기 실시예 1 내지 3에 따른 지질의 추출 회수율을 비교하기 위하여 지질 표준 물질들(LPC 17:0, Cer d17:0, SM d17:0, TG 15:0/15:0/15:0, PC 19:0/19:0, PG 17:0/17:0, PE 17:0/17:0, PS 17:0/17:0)에 대해 양이온과 음이온 모드에서 각각 회수시험(recovery test)을 진행하였다. 양이온 모드에서 TG를 제외한 모든

지질표준 물질 그리고 음이온 모드에선 모든 지질 물질에 대해 실시예 1에 비해 본 발명에 따른 방법(실시예 3)이 회수율이 높은 것으로 확인되었다.

[60]

[61] 실험예 2. 추출 방법에 따른 민감도 및 정량성 비교

[62] 상기 실시예 1 내지 3에 따른 지질의 추출 효율을 비교하기 위하여 양이온 모드에서 PC(17:0/17:0), 그리고 음이온 모드에서 PG(17:0/17:0)를 각각 이용하여 LOD test를 진행하였다. 이때 LOD는 $3.3 \times \text{standard deviation/slope}$ 를 이용하여 산출하고, 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.

[63] 양이온 모드의 경우, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 LOD는 각각 0.2431, 0.3096 및 0.0351 pmole으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우 mFolch에 비해 7배 및 SAP에 비해 9배 이상 추출 효율이 증가한 것으로 확인되었다 (도 3). 음이온 모드의 경우도, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 LOD는 각각 0.2340, 0.2359 및 0.1280 pmole으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우 mFolch 및 SAP에 비해 2배 이상 추출 효율이 증가한 것으로 확인되었다 (도 4). 한편, 조사된 표준 지질 물질의 농도 영역내(0.5 ~ 40 pmol)에서 보여주는 직선성에 대한 상관관계수(r^2)를 비교하면 양이온 모드의 경우, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 r^2 값은 각각 0.9955, 0.9955 그리고 0.9997으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우가 정량성이 우수한 것으로 확인되었다 (도 3). 음이온 모드의 경우도, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 r^2 값은 각각 0.996, 0.999 그리고 0.9999으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우가 정량성이 우수한 것으로 확인되었다 (도 4).

[64]

[65] 실험예 3. 추출 방법에 따른 재현성 비교

[66] 상기 실시예 1 내지 3에 따른 지질 추출시 안정성 및 재현성을 비교하기 위하여 양이온 모드 및 음이온 모드에 대해 Inter-day 그리고 Intra-day RSD test를 진행하였다. 이때 각 실험은 하루 당 5번씩 5일간 진행하였다, 그 결과를 도 5 및 6에 나타내었다.

[67] 양이온 모드의 경우, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 Inter-day RSD는 각각 11.06, 16.35 및 4.96 %으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우 재현성이 가장 우수한 것으로 확인되었다 (도 5). 음이온 모드의 경우도, 실시예 1, 실시예 2 및 실시예 3의 Inter-day RSD는 각각 5.60, 11.00 및 4.73 %으로써 본 발명에 따른 방법에 의해 지질체를 추출하는 경우 재현성이 가장 우수한 것으로 확인되었다 (도 6).

[68]

[69] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라

설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[70]

[71]

[72]

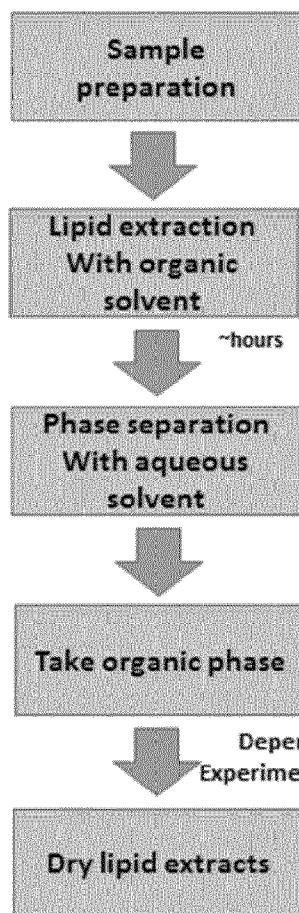
청구범위

- [청구항 1] 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)로 채워진 스핀-컬럼을 이용한 지질체의 추출방법으로, 상기 방법은:
 (A) 수용성 시료를 고흡수성 수지 비드로 채워진 스핀-컬럼에 첨가하여 혼합 흡수 시키는 단계;
 (B) 상기 고흡수성 수지 비드에 유기용매를 첨가하여 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지에 흡수되는 수용액 층과 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기용매 액체층이 교체화된 수용액 층과 분리되는 단계; 및
 (C) 상기 고흡수성 수지 비드를 포함하는 수용액층으로부터 원심분리하여 지질체를 포함한 유기용매층을 분리하는 단계를 포함하는 것인, 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 비드의 평균 직경은 1.5 mm 이하 인 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 분뇨, 림프액, 양수, 조직, 세포 및 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
 상기 유기용매는 알킬 에테르, 디알킬 케톤, 아미드, 에스테르, 알콜 및 술폰사이드로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 방법은: (A) 수용성 시료를 고흡수성 수지 비드로 채워진 스핀-컬럼에 첨가하여 혼합 흡수 시키는 단계; (B) 상기 고흡수성 수지 비드에 MeOH 및 MTBE(methyl tert-butyl ether)를 첨가하여 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지 비드에 흡수되는 수용액 층과 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기 용매 액체층이 교체화된 수용액 층과 분리되는 단계; 및 (C) 상기 고흡수성 수지 비드를 포함하는 수용액층으로부터 6,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 지질체를 포함하는 유기용매층을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 방법.
- [청구항 6] (a) 수용성 시료와 유기용매가 유입되는 유입부;
 (b) 수용성 시료를 혼합 흡수하기 위한 고흡수성 수지 비드(Super Absorbent Polymer Bead, SAPB)를 포함하는 수용부; 및
 (c) 상기 수용부 내의 수용성 시료, 유기용매 및 고흡수성 수지 비드 혼합물로부터 원심분리된 지질체가 배출되는 배출부를 포함하는 고흡수성 수지 비드를 이용한 지질체 추출 키트로서,

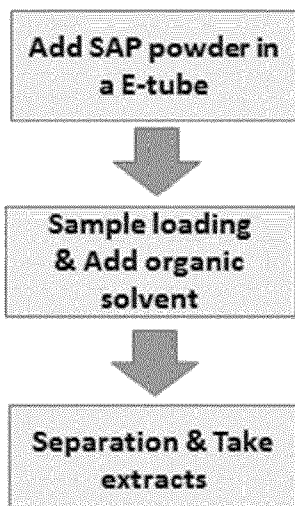
상기 수용부 내의 수용성 시료가 혼합 흡수된 고흡수성 수지 비드에 유기용매가 첨가되면 수용성 시료 내 수용성 물질이 고흡수성 수지에 흡수되는 수용액 층과 소수성 물질이 유기용매 층으로 각각 분리 용해되어 유기용매 액체층이 고체화된 수용액 층과 분리되는 것을 특징으로 하는 것인, 키트.

- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 키트는 상기 수용부와 상기 배출부 사이에 마련되어 원심분리되는 상기 지질체를 여과하는 필터부를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 것인, 키트.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 비드의 평균 직경은 1.5 mm 이하 인 것을 특징으로 하는 것인, 키트.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 분뇨, 림프액, 양수, 조직, 세포 및 미생물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 키트.
- [청구항 10] 제6항에 있어서,
상기 유기용매는 알킬 에테르, 디알킬 케톤, 아미드, 에스테르, 알콜 및 술폰사이드로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 키트.

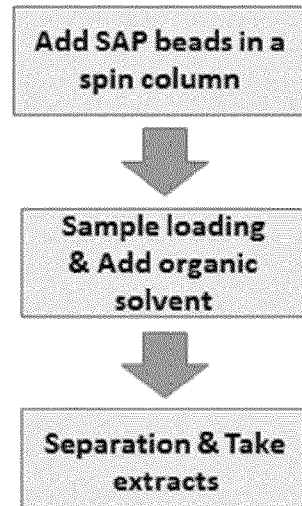
[도1]

Modified Folch method

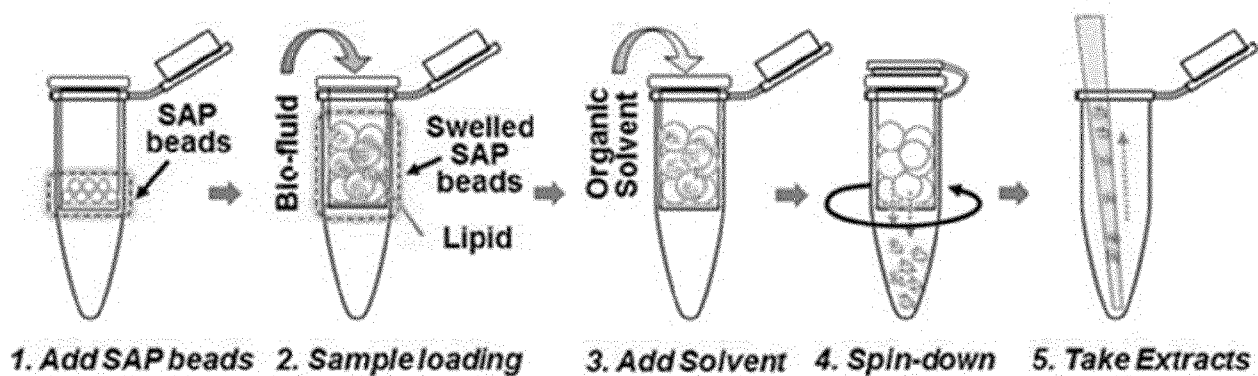
Large amount of samples and solvents

SAP method

~10 min
Small amount of samples and solvents
Depending on experimental skill

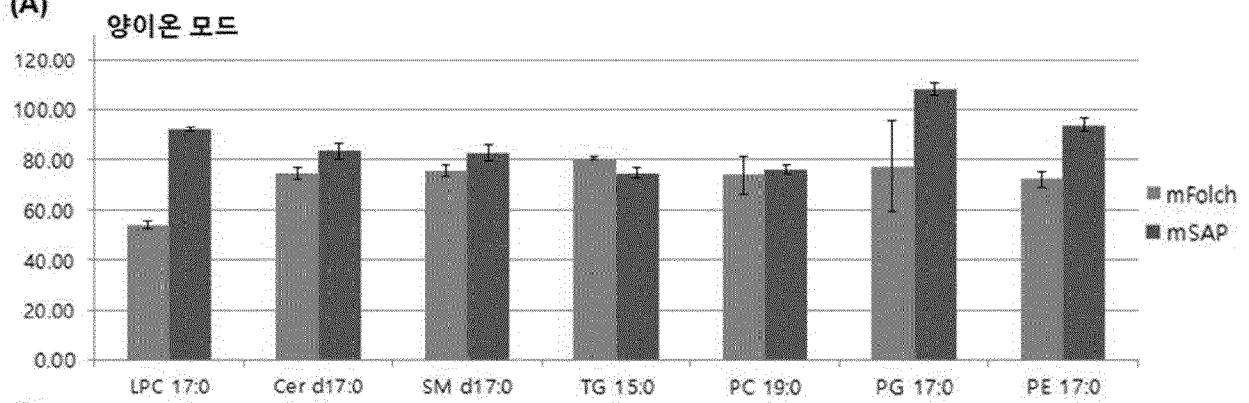
Modified SAP method

~10 min easy
Small amount of
samples and solvents

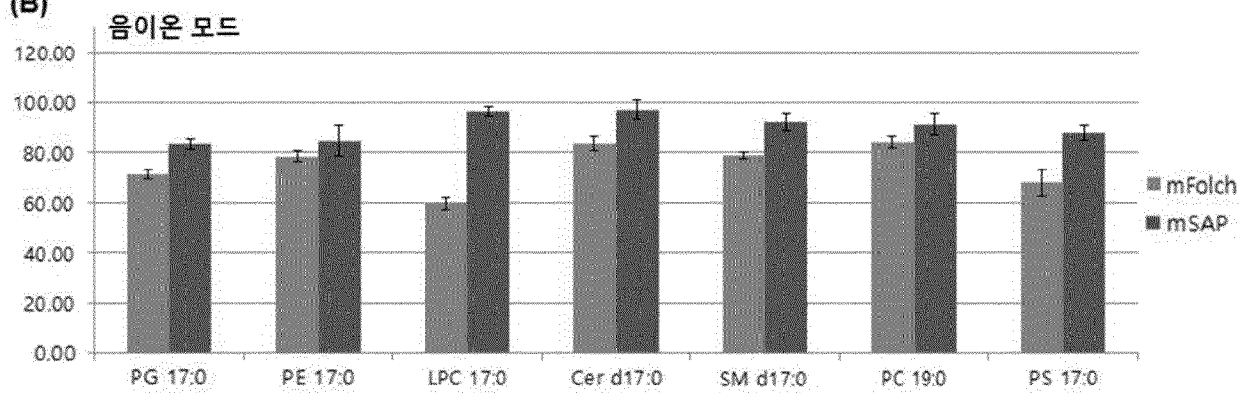
Modified SAP method

[도2]

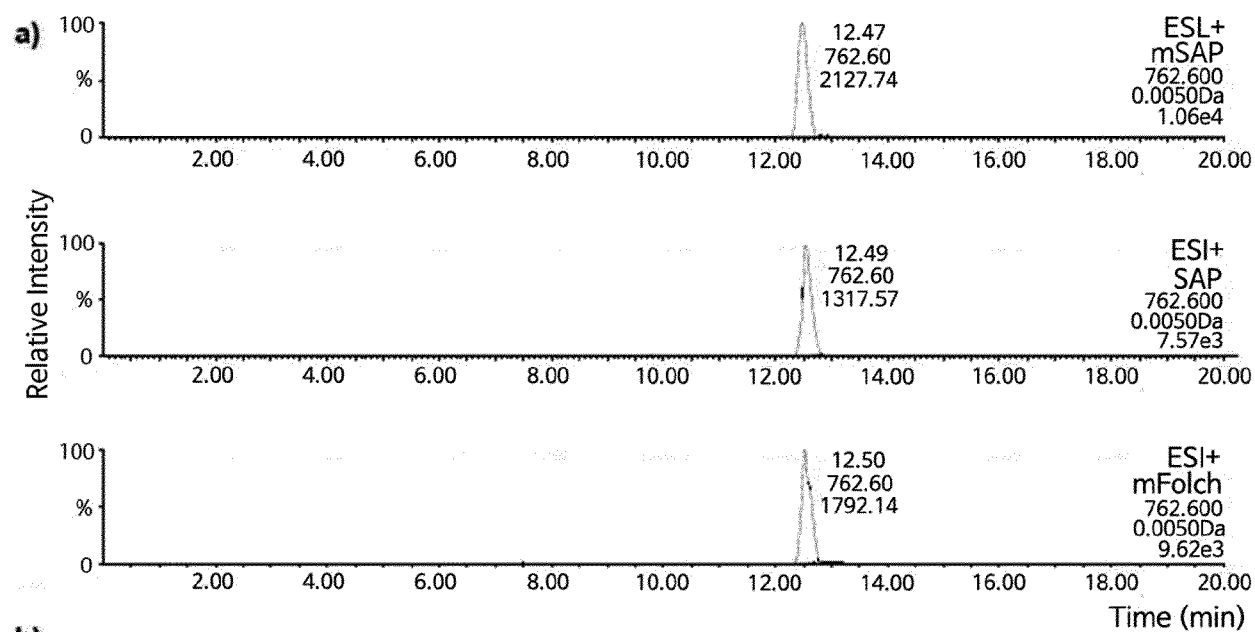
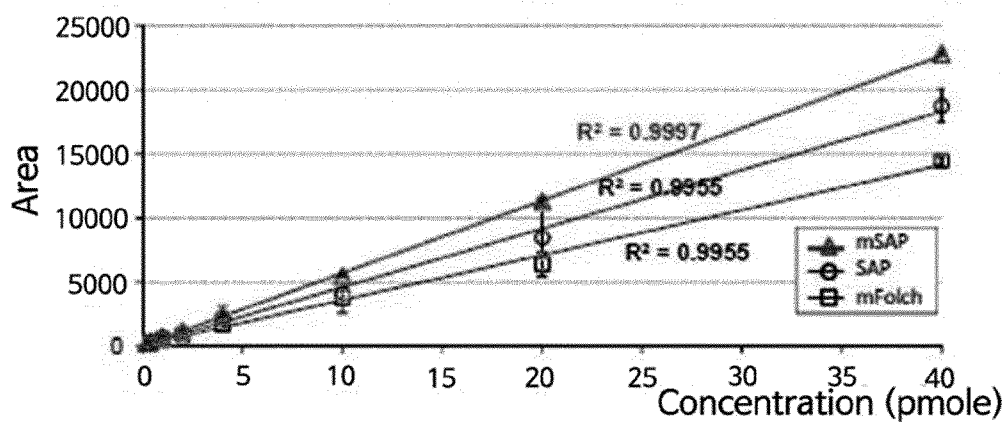
(A)



(B)



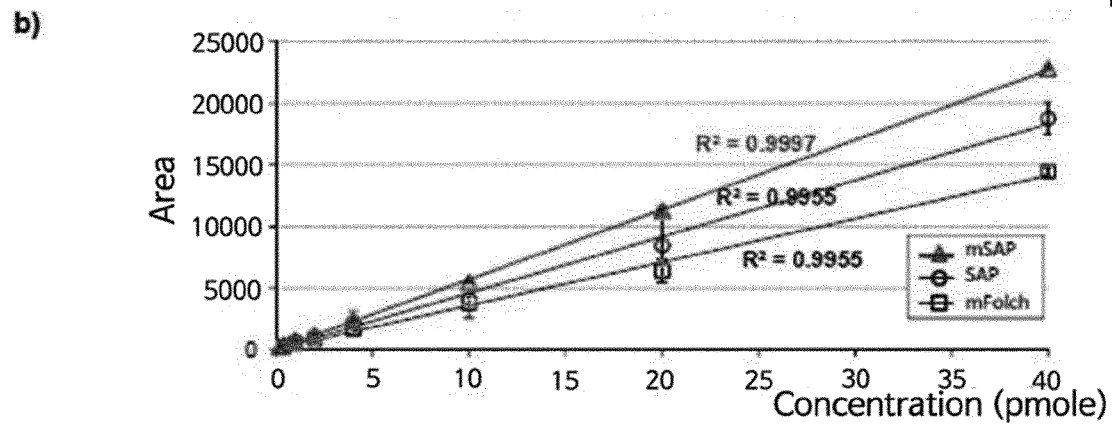
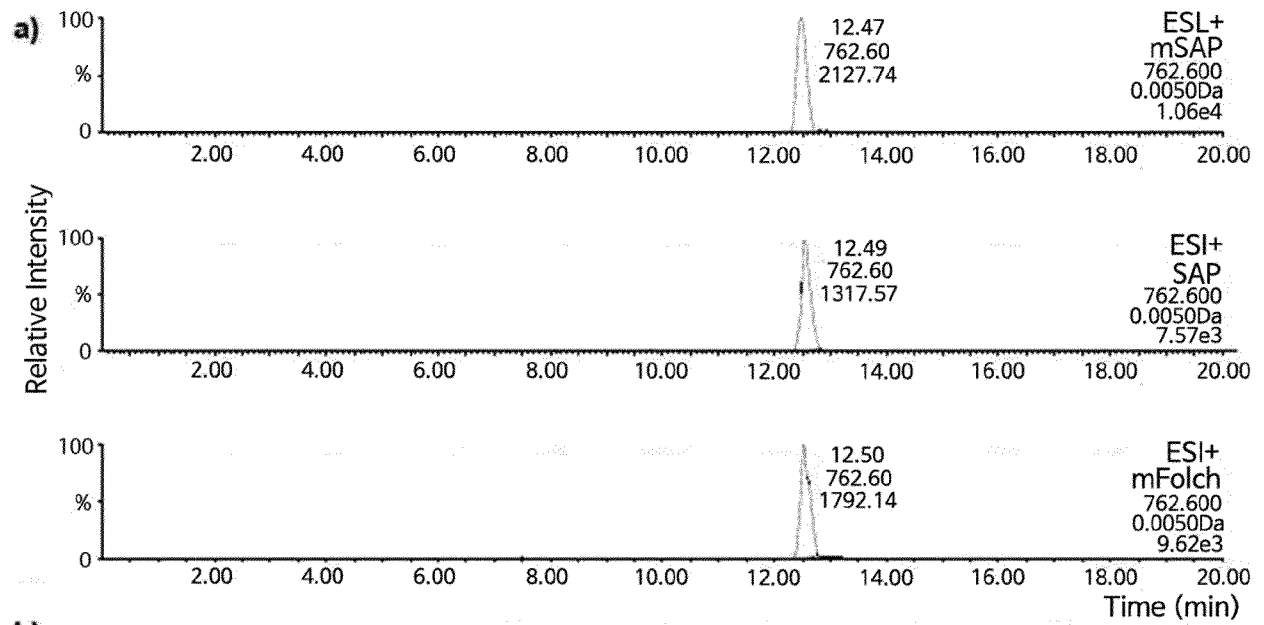
[도3]

**b)**

$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{Standard deviation/slope}$$

	mSAP	SAP	mFolch
LOD (pmole)	0.0351	0.3096	0.2431

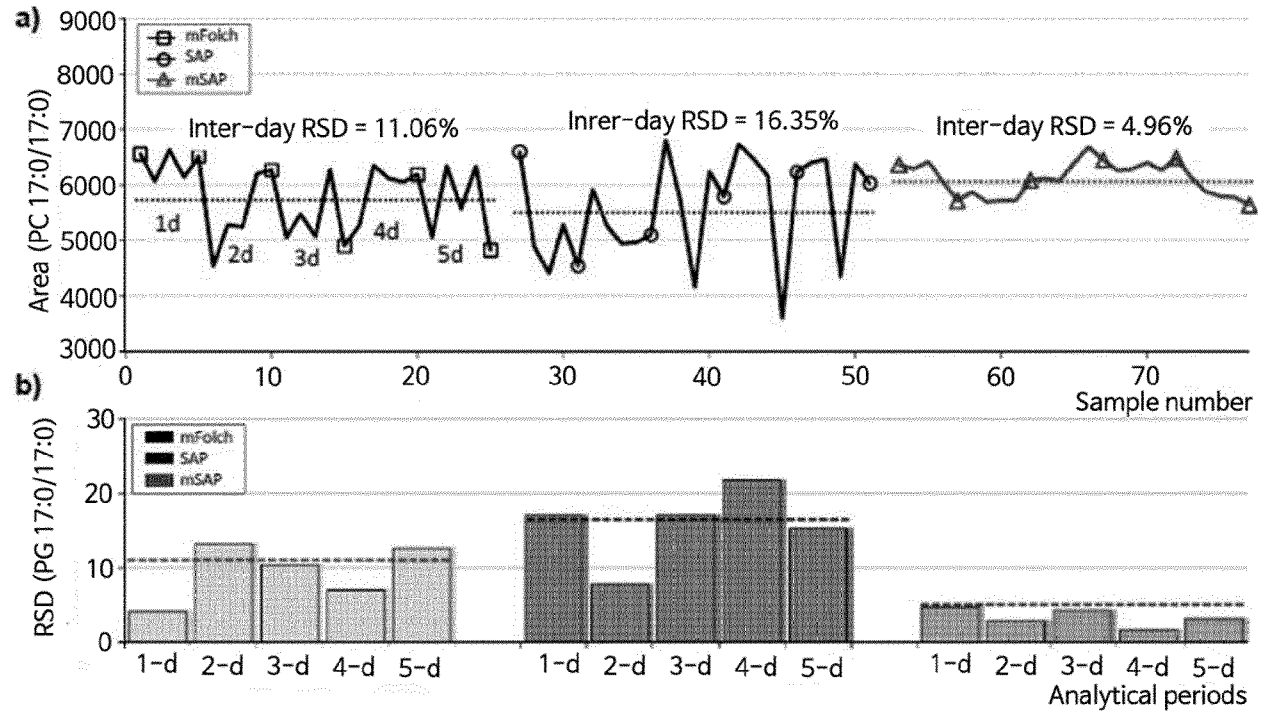
[도4]



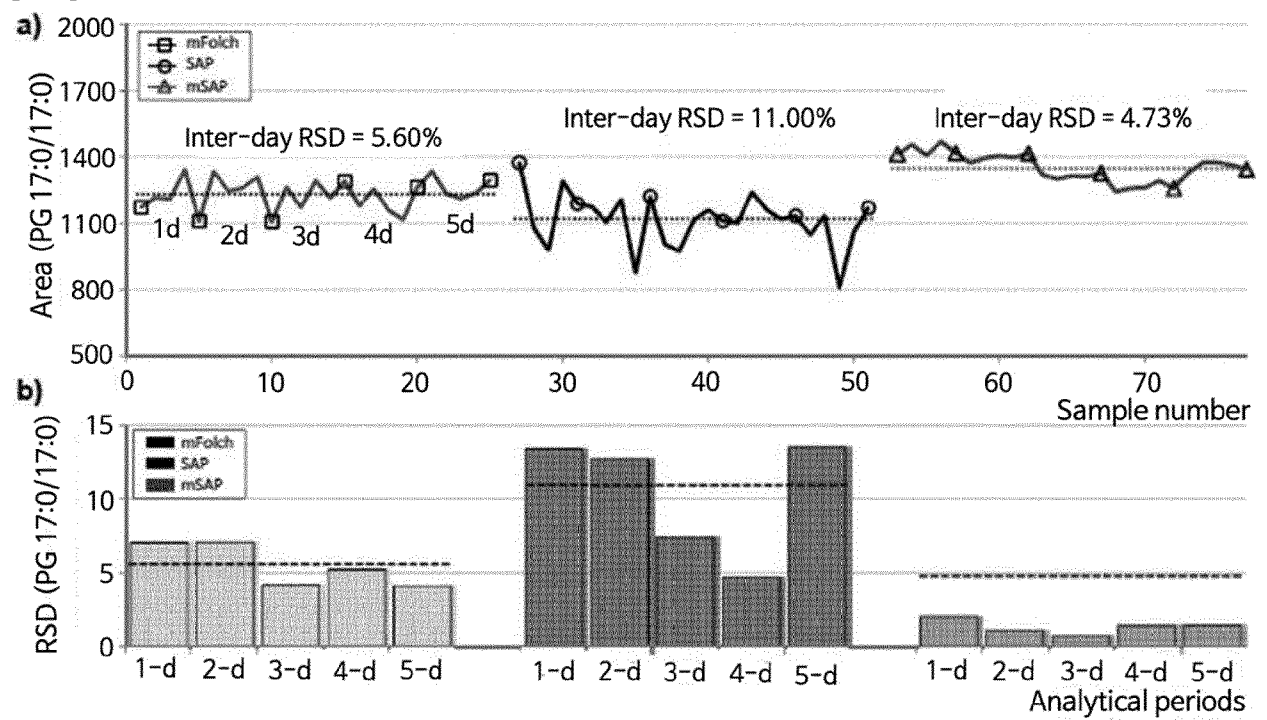
$$\text{LOD} = 3.3 \times \text{Standard deviation/slope}$$

	mSAP	SAP	mFolch
LOD (pmole)	0.0351	0.3096	0.2431

[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/000712

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 1/38(2006.01)i, G01N 33/487(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 1/38; A23L 1/015; B01D 11/04; B04B 5/02; B04B 7/16; C07H 21/04; C12Q 1/68; G01N 1/10; G01N 33/483; G01N 33/487

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: resin bead, centrifugation, lipid, spin column

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002-0102563 A1 (GJERDE et al.) 01 August 2002 See paragraphs [0083], [0084], [0148]-[0159], claims 1, 18, 20 and figure 1.	1-10
Y	KR 10-1816288 B1 (KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE) 09 January 2018 See paragraphs [0020]-[0031], [0075], claims 1, 3-6 and figures 2, 3.	1-10
Y	KR 10-2013-0111153 A (APINTECH, INC.) 10 October 2013 See paragraphs [0018]-[0038], claim 1 and figures 1-6.	7
A	JP 2013-533978 A (QIAGEN GMBH.) 29 August 2013 See paragraphs [0025]-[0046] and figures 1, 2.	1-10
A	US 2014-0339160 A1 (CERTO LABS, INC.) 20 November 2014 See claims 1, 27 and figure 1.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 JUNE 2019 (12.06.2019)

Date of mailing of the international search report

12 JUNE 2019 (12.06.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/000712

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2002-0102563 A1	01/08/2002	AU 1998-96958 A1	03/05/1999
		AU 1999-10779 A1	03/05/1999
		AU 1999-10779 B2	03/10/2002
		AU 1999-12942 A1	24/05/1999
		AU 1999-12942 B2	29/08/2002
		AU 1999-12975 A1	24/05/1999
		CA 2308314 A1	14/05/1999
		CA 2309760 A1	22/04/1999
		CA 2375746 A1	22/03/2001
		CA 2393849 A1	28/06/2001
		EP 1017841 A1	12/07/2000
		EP 1023306 A1	02/08/2000
		EP 1023306 A4	16/01/2002
		EP 1023306 B1	13/08/2003
		EP 1023463 A1	02/08/2000
		EP 1025113 A1	09/08/2000
		EP 1025113 A4	09/01/2002
		EP 1027121 A1	16/08/2000
		JP 2000-516638 A	12/12/2000
		JP 2001-504235 A	27/03/2001
		JP 2001-512702 A	28/08/2001
		JP 2001-515217 A	18/09/2001
		JP 2001-521729 A	13/11/2001
		JP 2001-524133 A	27/11/2001
		JP 2002-093635 A	29/03/2002
		US 2001-0008761 A1	19/07/2001
		US 2001-0023290 A1	20/09/2001
		US 2001-0023848 A1	27/09/2001
		US 2001-0030156 A1	18/10/2001
		US 2001-0032817 A1	25/10/2001
		US 2001-0042714 A1	22/11/2001
		US 2001-0047961 A1	06/12/2001
		US 2001-0051715 A1	13/12/2001
		US 2002-0003109 A1	10/01/2002
		US 2002-0036169 A1	28/03/2002
		US 2002-0038786 A1	04/04/2002
		US 2002-0092811 A1	18/07/2002
		US 2002-0123063 A1	05/09/2002
		US 2002-0153312 A1	24/10/2002
		US 2002-0158017 A1	31/10/2002
		US 2002-0169309 A1	14/11/2002
		US 2002-0180572 A1	05/12/2002
		US 2002-0185441 A1	12/12/2002
		US 2002-0197629 A1	26/12/2002
		US 2002-0197638 A1	26/12/2002
		US 2003-0057154 A1	27/03/2003
		US 2003-0064524 A1	03/04/2003
		US 2003-0075503 A1	24/04/2003
		US 2003-0102260 A1	05/06/2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/000712

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 2003-0144500 A1	31/07/2003
		US 2003-0165941 A1	04/09/2003
		WO 02-40130 A1	23/05/2002
KR 10-1816288 B1	09/01/2018	WO 2018-030709 A1	15/02/2018
KR 10-2013-0111153 A	10/10/2013	KR 10-1495631 B1	26/02/2015
		WO 2013-147515 A1	03/10/2013
JP 2013-533978 A	29/08/2013	CN 103168222 A	19/06/2013
		CN 107202727 A	26/09/2017
		EP 2593770 A1	22/05/2013
		JP 2016-166903 A	15/09/2016
		JP 6161205 B2	12/07/2017
		US 2013-0115693 A1	09/05/2013
		WO 2012-007502 A1	19/01/2012
US 2014-0339160 A1	20/11/2014	WO 2013-040706 A1	28/03/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 1/38(2006.01)i, G01N 33/487(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 1/38; A23L 1/015; B01D 11/04; B04B 5/02; B04B 7/16; C07H 21/04; C12Q 1/68; G01N 1/10; G01N 33/483; G01N 33/487

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 수지 비드(polymer bead), 원심(centrifugation), 지질체(lipid), 스핀 컬럼(spin column)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2002-0102563 A1 (GJERDE et al.) 2002.08.01 단락 [0083], [0084], [0148]-[0159], 청구항 1, 18, 20 및 도면 1 참조.	1-10
Y	KR 10-1816288 B1 (한국기초과학지원연구원) 2018.01.09 단락 [0020]-[0031], [0075], 청구항 1, 3-6 및 도면 2, 3 참조.	1-10
Y	KR 10-2013-0111153 A ((주)어핀텍) 2013.10.10 단락 [0018]-[0038], 청구항 1 및 도면 1-6 참조.	7
A	JP 2013-533978 A (QIAGEN GMBH) 2013.08.29 단락 [0025]-[0046] 및 도면 1, 2 참조.	1-10
A	US 2014-0339160 A1 (CERTO LABS, INC.) 2014.11.20 청구항 1, 27 및 도면 1 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 06월 12일 (12.06.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 06월 12일 (12.06.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이현길

전화번호 +82-42-481-8525



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2002-0102563 A1	2002/08/01	AU 1998-96958 A1	1999/05/03
		AU 1999-10779 A1	1999/05/03
		AU 1999-10779 B2	2002/10/03
		AU 1999-12942 A1	1999/05/24
		AU 1999-12942 B2	2002/08/29
		AU 1999-12975 A1	1999/05/24
		CA 2308314 A1	1999/05/14
		CA 2309760 A1	1999/04/22
		CA 2375746 A1	2001/03/22
		CA 2393849 A1	2001/06/28
		EP 1017841 A1	2000/07/12
		EP 1023306 A1	2000/08/02
		EP 1023306 A4	2002/01/16
		EP 1023306 B1	2003/08/13
		EP 1023463 A1	2000/08/02
		EP 1025113 A1	2000/08/09
		EP 1025113 A4	2002/01/09
		EP 1027121 A1	2000/08/16
		JP 2000-516638 A	2000/12/12
		JP 2001-504235 A	2001/03/27
		JP 2001-512702 A	2001/08/28
		JP 2001-515217 A	2001/09/18
		JP 2001-521729 A	2001/11/13
		JP 2001-524133 A	2001/11/27
		JP 2002-093635 A	2002/03/29
		US 2001-0008761 A1	2001/07/19
		US 2001-0023290 A1	2001/09/20
		US 2001-0023848 A1	2001/09/27
		US 2001-0030156 A1	2001/10/18
		US 2001-0032817 A1	2001/10/25
		US 2001-0042714 A1	2001/11/22
		US 2001-0047961 A1	2001/12/06
		US 2001-0051715 A1	2001/12/13
		US 2002-0003109 A1	2002/01/10
		US 2002-0036169 A1	2002/03/28
		US 2002-0038786 A1	2002/04/04
		US 2002-0092811 A1	2002/07/18
		US 2002-0123063 A1	2002/09/05
		US 2002-0153312 A1	2002/10/24
		US 2002-0158017 A1	2002/10/31
		US 2002-0169309 A1	2002/11/14
		US 2002-0180572 A1	2002/12/05
		US 2002-0185441 A1	2002/12/12
		US 2002-0197629 A1	2002/12/26
		US 2002-0197638 A1	2002/12/26
		US 2003-0057154 A1	2003/03/27
		US 2003-0064524 A1	2003/04/03
		US 2003-0075503 A1	2003/04/24
		US 2003-0102260 A1	2003/06/05

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2003-0144500 A1	2003/07/31
		US 2003-0165941 A1	2003/09/04
		WO 02-40130 A1	2002/05/23
KR 10-1816288 B1	2018/01/09	WO 2018-030709 A1	2018/02/15
KR 10-2013-0111153 A	2013/10/10	KR 10-1495631 B1	2015/02/26
		WO 2013-147515 A1	2013/10/03
JP 2013-533978 A	2013/08/29	CN 103168222 A	2013/06/19
		CN 107202727 A	2017/09/26
		EP 2593770 A1	2013/05/22
		JP 2016-166903 A	2016/09/15
		JP 6161205 B2	2017/07/12
		US 2013-0115693 A1	2013/05/09
		WO 2012-007502 A1	2012/01/19
US 2014-0339160 A1	2014/11/20	WO 2013-040706 A1	2013/03/28