



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106908597 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(21)申请号 201710118407.8

(22)申请日 2017.03.01

(71)申请人 花锦

地址 030024 山西省太原市万柏林区漪汾街8号

(72)发明人 花锦

(51)Int.Cl.

G01N 33/536(2006.01)

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

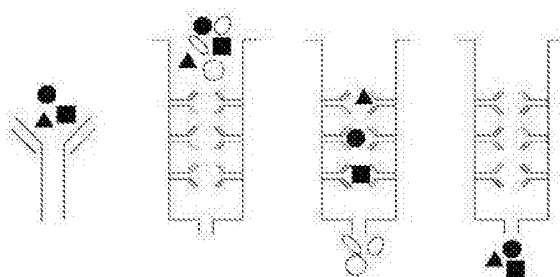
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

## (54)发明名称

一种免疫亲和柱的制备方法

## (57)摘要

本发明公开了一种免疫亲和柱的制备方法，主要由三种抗体和偶联基质偶联后湿法装柱获得三种免疫亲和柱，并按照体积1:1:1混合装柱，制备的一种复合亲和柱。其柱容量为2500 ng，净化效果好，可被重复利用3次，平均回收率在67%~107%之间。该复合免疫亲和柱至少对12种磺胺类药物都有很好的特异性吸附，包括：磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪钠、磺胺间甲氧嘧啶。制备得到这种偶联率高、特异性吸附性强、柱容量和回收率高的免疫亲和柱，并提出可同时检测上述12种磺胺类药物残留的灵敏、快速、简便的分析方法。



1. 一种免疫亲和柱的制备方法, 其特征在于, 所述的免疫亲和柱为检测净化磺胺类药物残留的免疫亲和柱, 所述的免疫亲和柱是由三种免疫亲和柱按照体积1:1:1混合装柱, 制得的复合亲和柱, 所述的三种免疫亲和柱是由三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7分别与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联, 湿法装柱制得的三种免疫亲和柱, 具体制备过程如下: 第一步: 两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA的制备, 由四甲基硫代二碳二酰胺TS和SM2磺胺二甲嘧啶抗原与牛血清白蛋白BSA和卵清蛋白偶联而得; 第二步: 第一步所得的抗原为免疫原对小鼠免疫后得到B淋巴细胞, B淋巴细胞与骨髓瘤细胞细胞融合得杂交瘤细胞, 采用体内诱生腹水法制备得到上述3种单克隆抗体, 第三步: 三种免疫亲和柱, 由第二步的种单克隆抗体与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联, 湿法装柱, 得到的三种免疫亲和柱。

2. 根据权利要求1所述的免疫亲和柱的制备方法, 其特征在于, 所述的第一步: 两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA、的制备, 具体制备步骤如下: (1) SM2半抗原的合成: SM2 溶于无水硫酸钠处理过的吡啶, 丁二酸酐溶于无水吡啶与SM2液混匀溶解, 搅拌反应24 h, 反应液移入置有水的1分液漏斗中摇匀, 静置, 用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>进行萃取轻摇, 注意放气萃取3次, 收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相, 合并3次萃取CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相, 用0.1mol/L HCl洗提3次后, 用H<sub>2</sub>O 再洗一次收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相, 在萃取液中加入一定量的无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水, 在蒸发皿中加入甲苯低温蒸干, 将滤液真空干燥重结晶用乙酸乙酯洗涤糊状物得到白色晶体SM2-SA, (2) SM2-BSA偶联蛋白质的制备: 取步骤(1)制得的10 mg SM2-SA溶解在0.5 mL的无水DMF中, 再加入6 mg NHS和10 mg DCC室温搅拌过夜, 以4000r/min离心5min离心除去沉淀后将上清液, 慢慢地边搅拌边滴加于20 mg溶于2 mL的碳酸盐缓冲液的BSA和溶液中, 搅拌反应4 h, 反应结束以后取上清液装入透析袋, 用pH 7.4的磷酸缓冲液PBS缓冲液透析2 天, 每天更换3次透析液, 得M2-BSA偶联蛋白质; (3) 半抗原TS的合成, TS合成步骤: 称取2-氨基-4-噻唑乙酸7.8 g加入到100 mL无水甲醇中, 加入20mL三甲基氯硅烷, 0℃回流2 d, 旋转蒸发去除有机溶剂, 用250mL乙酸乙酯提取, 用50 mL饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗四次(至pH>7), 30 mL饱和NaCl水溶液洗2次, MgSO<sub>4</sub>干燥, 过滤, 旋转蒸发, 用30 mL乙酸乙酯和5 mL甲醇重结晶, 得到(2-氨基-4-噻唑基)-乙酸甲酯, 用5 mL吡啶溶解, 加入3.6 g N-乙酰磺胺酰氯, 室温搅拌24 h, 反应完, 加入2 mL乙醇, 用4M HCl调节pH至3, 10-20分钟后产生沉淀, 过滤后真空干燥, 得到产物, 将产物溶解到25 mL 2M氢氧化钠溶液中, 室温回流5h, 用4M的盐酸调节PH 4, 用25mL乙酸乙酯萃取4次, 用硫酸镁干燥, 旋转蒸干得到TS; (4) TS-BSA的合成, 4.1称取TS 62 mg, NHS 34 mg, DCC 44 mg, 溶解到1.5 mL DMF中, 室温搅拌24 h; 分别称取BSA 20mg溶解到3 mL pH 7.0 PBS中, 分别将上述步骤中制得的0.5 mL DMF溶液, 缓慢滴加到蛋白溶液中, 室温搅拌24 h, 用pH 7.0 磷酸缓冲液PBS溶液透析3 h, 通过紫外扫描, 计算出TS-BSA偶联比分别为10:1; SM2-BSA偶联比分别为15:1。

3. 根据权利要求1所述的免疫亲和柱的制备方法, 所述的第二步, 制备得到上述3种单克隆抗体, 分别为三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7, 其中巴曲霉毒素单克隆抗体5H4是由SM2-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株, NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7是由ST-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株。

## 一种免疫亲和柱的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测净化磺胺类药物残留的免疫亲和柱的制备,属于免疫学和食品检测检疫技术领域。

### 背景技术

[0002] 动物源性食品中的磺胺类药物残留是广泛关注的一类兽药,这些残留进入人体后会引起人体的过敏反应,并可能具有一定的致癌性。因此,对磺胺类药物残留的研究成为检食品检测工作者的焦点。检测过程中基质的干扰比较大,目前检测的净化方法主要有固相萃取、液液萃取等,操作较为繁琐,净化动物源性样品前处理复杂;选择性比较低,且净化效果不理想,杂质干扰很大;回收率和重复性比较差。

### 发明内容

[0003] 为解决现有技术存在的技术问题,本发明提供了一种特异性高、净化效果好、操作简便的免疫亲和柱(Immunoaffinity column,IAC),并研究开发适合于肉蛋奶等多种动物源性食品基质,能够降低液质联用仪检测时存在的基质效应,可同时检测多种磺胺类药物残留的灵敏、快速、简便的分析方法。

[0004] 本发明技术方案如下:一种免疫亲和柱的制备方法,所述的免疫亲和柱为检测净化磺胺类药物残留的免疫亲和柱,所述的免疫亲和柱是由三种免疫亲和柱按照体积1:1:1混合装柱,制得的复合亲和柱,所述的三种免疫亲和柱是由三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7分别与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联,湿法装柱制得的三种免疫亲和柱,具体制备过程如下:

第一步:两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA的制备,由四甲基硫代二碳二酰胺TS和SM2磺胺二甲嘧啶抗原与牛血清白蛋白BSA和卵清蛋白偶联而得;

第二步:第一步所得的抗原为免疫原对小鼠免疫后得到B淋巴细胞,B淋巴细胞与骨髓瘤细胞细胞融合得杂交瘤细胞,采用体内诱生腹水法制备得到上述3种单克隆抗体,

第三步:三种免疫亲和柱,由第二步的种单克隆抗体与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联,湿法装柱,得到的三种免疫亲和柱。

[0005] 所述的第一步:两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA、的制备,具体制备步骤如下:

(1) SM2半抗原的合成: SM2 溶于无水硫酸钠处理过的吡啶,丁二酸酐溶于无水吡啶与SM2液混匀溶解,搅拌反应24 h,反应液移入置有水的1分液漏斗中摇匀,静置,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>进行萃取轻摇,注意放气萃取3次,收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,,合并3次萃取CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,用0.1mol/L HCl洗提3次后,用H<sub>2</sub>O 再洗一次收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,在萃取液中加入一定量的无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水,在蒸发皿中加入甲苯低温蒸干,将滤液真空干燥重结晶用乙酸乙酯洗涤糊状物得到白色晶体SM2-SA,

(2) SM2-BSA偶联蛋白质的制备:取步骤(1)制得的10 mg SM2-SA溶解在0.5 mL的无水

DMF中,再加入6 mg NHS和10 mg DCC室温搅拌过夜,以4000r/min离心5min离心除去沉淀后将上清液,慢慢地边搅拌边滴加于20 mg溶于2 mL的碳酸盐缓冲液的BSA和溶液中,搅拌反应4 h,反应结束以后取上清液装入透析袋,用pH 7.4的磷酸缓冲液PBS缓冲液透析2 天,每天更换3次透析液,得M2-BSA偶联蛋白质。

#### [0006] (3) 半抗原TS的合成

TS合成步骤:称取2-氨基-4-噻唑乙酸7.8 g加入到100 mL无水甲醇中,加入20mL三甲基氯硅烷,0℃回流2 d。旋转蒸发去除有机溶剂,用250mL乙酸乙酯提取,用50 mL饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗四次(至pH>7),30 mL饱和NaCl水溶液洗2次,MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,旋转蒸发,用30 mL乙酸乙酯和5 mL甲醇重结晶,得到(2-氨基-4-噻唑基)-乙酸甲酯。用5 mL吡啶溶解,加入3.6 g N-乙酰磺胺酰氯,室温搅拌24 h,反应完,加入2 mL乙醇,用4M HCl调节pH至3,10-20分钟后产生沉淀,过滤后真空干燥,得到产物,将产物溶解到25 mL 2M氢氧化钠溶液中,室温回流5h,用4M的盐酸调节PH 4,用25mL乙酸乙酯萃取4次,用硫酸镁干燥,旋转蒸干得到TS;

#### (4) TS-BSA的合成

4.1称取TS 62 mg,NHS 34 mg,DCC 44 mg,溶解到1.5 mL DMF中,室温搅拌24 h;分别称取BSA 20mg溶解到3 mL pH 7.0 PBS中,分别将上述步骤中制得的0.5 mL DMF溶液,缓慢滴加到蛋白溶液中,室温搅拌24 h,用pH 7.0 磷酸缓冲液PBS溶液透析3 h,

通过紫外扫描,计算出TS-BSA偶联比分别为10:1;SM2-BSA偶联比分别为15:1。

[0007] 所述的第二步,制备得到上述3种单克隆抗体,分别为三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7,其中巴曲霉毒素单克隆抗体5H4是由SM2-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株,NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7是由ST-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株。

[0008] 本实验新型1.0g 溴化氰活化的Sephacrose 4B制备了3.5 mL基质,分别与偶联缓冲液透析后的10 mg三种磺胺抗体偶联,偶联率均高达99%以上。偶联后,湿法装柱,得到的三种1AC分别只能对3种,8种和7种磺胺类药物(共12种)有很好的特异性吸附;本实验将三种偶联的琼脂糖凝胶按照体积1:1:1混合装柱,制备复合亲和柱。对复合柱子的洗脱条件进行优化,并对柱子的性能参数进行测试。柱子的洗脱条件为:用2.0 mL纯甲醇洗脱,柱性能测试结果为:抗体的偶联率大于99%,柱容量为2500 ng/g基质,该复合1AC柱对12种磺胺类药物都有很好的特异性吸附。

[0009] 这12种磺胺类药物分别为:磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺异噁唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪钠、磺胺间甲氧嘧啶。

[0010] 本方法建立了同时检测猪肉、牛奶中12种磺胺类药物残留量的免疫亲和净化-超高效液相色谱法和相色谱串联质谱法。

[0011] 本发明的优点是:制备得到偶联率高、特异性吸附性强、柱容量和回收率高的免疫亲和柱,它的高选择性使样本前处理过程大大简化,尤其适用于兔肉、鸡蛋等动物源性食品中磺胺类兽药残留的检测,分析质量得到改善;对待测组分有很强的保留和浓缩能力,特别适用于复杂样品中浓度极低组分的分离富集;对组分净化的同时提供定性信息;有多组分处理能力;水相操作,且能重复使用,可以减少分析成本;对待测物选择性的富集使分析方

法的检测限主要取决于样品量,这是理想净化手段难以实现的;作为理化仪器分析的净化手段,结合色谱法高效检测磺胺类药物残留量,可以避免使用免疫分析直接检测样本时待测物信息量太少、影响因素多、定量准确性不足等问题,显示了免疫学技术和常规理化技术在分析机制方面的互补性。

## 附图说明

[0012]

图1. 检测净化磺胺类药物残留的免疫亲和柱使用和再生示意图。

## 具体实施方式

[0013] 为了能更清楚地理解本发明的技术方案,下面结合具体的实施例进一步说明。

[0014] 一种免疫亲和柱的制备方法,所述的免疫亲和柱为检测净化磺胺类药物残留的免疫亲和柱,所述的免疫亲和柱是由三种免疫亲和柱按照体积1:1:1混合装柱,制得的复合亲和柱,所述的三种免疫亲和柱是由三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7分别与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联,湿法装柱制得的三种免疫亲和柱,具体制备过程如下:

第一步:两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA的制备,由四甲基硫代二碳二酰胺TS和SM2磺胺二甲嘧啶抗原与牛血清白蛋白BSA和卵清蛋白偶联而得;

第二步:第一步所得的抗原为免疫原对小鼠免疫后得到B淋巴细胞,B淋巴细胞与骨髓瘤细胞细胞融合得杂交瘤细胞,采用体内诱生腹水法制备得到上述3种单克隆抗体,

第三步:三种免疫亲和柱,由第二步的种单克隆抗体与珠状琼脂糖基质溴化氰活化Sephrose 4B偶联,湿法装柱,得到的三种免疫亲和柱。

[0015] 所述的第一步:两种磺胺类药物的人工抗原TS-BSA和SM2-BSA、的制备,具体制备步骤如下:

(1) SM2半抗原的合成: SM2 溶于无水硫酸钠处理过的吡啶,丁二酸酐溶于无水吡啶与SM2液混匀溶解,搅拌反应24 h,反应液移入置有水的1分液漏斗中摇匀,静置,用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>进行萃取轻摇,注意放气萃取3 次,收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,,合并3次萃取CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,用0.1mol/L HCl洗提3次后,用H<sub>2</sub>O 再洗一次收集下层CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>相,在萃取液中加入一定量的无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水,在蒸发皿中加入甲苯低温蒸干,将滤液真空干燥重结晶用乙酸乙酯洗涤糊状物得到白色晶体SM2-SA,

(2) SM2-BSA偶联蛋白质的制备:取步骤(1)制得的10 mg SM2-SA溶解在0.5 mL的无水DMF中,再加入6 mg NHS和10 mg DCC室温搅拌过夜,以4000r/min离心5min离心除去沉淀后将上清液,慢慢地边搅拌边滴加于20 mg溶于2 mL的碳酸盐缓冲液的BSA和溶液中,搅拌反应4 h,反应结束以后取上清液装入透析袋,用pH 7.4的磷酸缓冲液PBS缓冲液透析2 天,每天更换3次透析液,得M2-BSA偶联蛋白质。

[0016] (3) 半抗原TS的合成

TS合成步骤:称取2-氨基-4-噻唑乙酸7.8 g加入到100 mL无水甲醇中,加入20mL三甲基氯硅烷,0℃回流2 d.旋转蒸发去除有机溶剂,用250mL乙酸乙酯提取,用50 mL饱和NaHCO<sub>3</sub>水溶液洗四次(至pH>7),30 mL饱和NaCl水溶液洗2次,MgSO<sub>4</sub>干燥,过滤,旋转蒸发,用

30 mL乙酸乙酯和5 mL甲醇重结晶,得到(2-氨基-4-噻唑基)-乙酸甲酯。用5 mL吡啶溶解,加入3.6 g N-乙酰磺胺酰氯,室温搅拌24 h,反应完,加入2 mL乙醇,用4M HCl调节pH至3,10-20分钟后产生沉淀,过滤后真空干燥,得到产物,将产物溶解到25 mL 2M氢氧化钠溶液中,室温回流5h,用4M的盐酸调节PH 4,用25mL乙酸乙酯萃取4次,用硫酸镁干燥,旋转蒸干得到TS;

#### (4) TS-BSA的合成

4.1称取TS 62 mg,NHS 34 mg,DCC 44 mg,溶解到1.5 mL DMF中,室温搅拌24 h;分别称取BSA 20mg溶解到3 mL pH 7.0 PBS中,分别将上述步骤中制得的0.5 mL DMF溶液,缓慢滴加到蛋白溶液中,室温搅拌24 h,用pH 7.0 磷酸缓冲液PBS溶液透析3 h,

通过紫外扫描,计算出TS-BSA偶联比分别为10:1;SM2-BSA偶联比分别为15:1。

[0017] 所述的第二步,制备得到上述3种单克隆抗体,分别为三种单克隆抗体巴曲霉毒素单克隆抗体5H4、NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7,其中巴曲霉毒素单克隆抗体5H4是由SM2-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株,NR3C2单克隆抗体2B5和PPBP单克隆抗体5C7是由ST-BSA免疫原免疫小鼠得到的细胞株。

#### [0018] 一.磺胺类药物抗原合成及抗体制备

以牛血清白蛋白(BSA, 99.9%)为载体蛋白,与SM2和TS抗原偶联成功合成了磺胺类药物人工抗原TS-BSA和SM2-BSA。TS-BSA的偶联比分别为10:1;SM2-BSA的偶联比分别为15:1。

[0019] 对小鼠进行免疫得到的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞细胞融合得杂交瘤细胞,采用体内诱生腹水法制备获得三种单克隆克隆抗体5H4,2B5和 5C7。5H4抗体对3种磺胺药物(磺胺二甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶)的抑制较好,2B5抗体对8种磺胺药物(磺胺噻唑啉、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲噻唑、磺胺异噻唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶)的抑制较好,5C7抗体对7种磺胺药物(磺胺噻唑啉、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲噻唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺氯吡嗪钠)的抑制较好,1C50均小于20 ng/mL。

#### [0020] 二.磺胺类药物免疫亲和柱的制备及其性能研究

1.基质制备:称取1.0 g CNBr活化的Sephacrose 4B(1g冻干基质粉末可形成3.5mL终体积的溶胀基质),溶于1mM HCl中(25℃,15min)。基质将会立即溶胀,然后置于烧结玻璃过滤器(孔隙度:G3)中使用1mM HCl洗涤15 min。

#### [0021] 2.配体偶联:

(1)用0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3 偶联缓冲液4℃透析偶联的抗体24 h,然后用偶联缓冲液控制三种磺胺抗体浓度,约2 mg/mL,以备偶联使用。使用10 mL偶联缓冲液洗涤溶胀后基质,洗涤后,迅速将基质转移到抗体溶液中。1 g基质Sephacrose 4B与15~35 mg抗体偶联。

[0022] (2)室温条件(20~25℃)下采用end-over-end的方式(轻柔缓和的搅拌方法)充分混匀上述的混和物2 h,或者在4℃下混匀过夜。

[0023] (3)2000 r/min离心1 min,将Sephacrose离心至管底,将上清液转移至新的离心管中,冰浴保存,测定上清液抗体浓度值,并计算偶联率。

$$[0024] \quad \text{偶联率}(\%) = \frac{\text{偶联前抗体总量} - \text{未偶联抗体量}}{\text{偶联前抗体总量}} \times 100\%$$

(4)取离心管底的Sephacrose 4B,使用至少5倍基质体积的偶联缓冲液进行洗涤,除去

多余的配体。

[0025] 3. 封闭:

(1) 封闭所有残留的活性基团, 转移基质至0.1 M Tris-HCl缓冲液, pH 8.0中。室温条件下静置2 h或者4℃条件下16 h。

[0026] (2) 为除去偶联后未偶联上的多余的配体, 依次用低、高两种pH的缓冲液对基质进行洗涤, 至少洗涤3个循环, 每种缓冲液的使用量至少5倍基质体积。

[0027] 每个洗涤循环步骤: 先用0.1 M醋酸-醋酸钠, pH 4.0内含0.5 M NaCl的缓冲液洗涤, 接着再用0.1 M Tris-HCl, pH 8.0内含0.5 M NaCl的缓冲液进行洗涤。

[0028] 4. 装柱: 采用湿法装柱, 柱子装好后, 用5倍柱床体积的无菌过滤的0.01% NaN<sub>3</sub>-PBS过柱, 并使用0.01% NaN<sub>3</sub>-PBS保存。

[0029] 5. 三种抗体制备的亲合柱特异性: 用三种磺胺类药物1AC柱对12种磺胺类药物特异性吸附。分别取100 ng的磺胺类药物标准溶液10.0 mL, 分别通过免疫亲和柱, 用10 mL纯水淋洗后, 用5.0 mL甲醇洗脱, 收集洗脱液, 用HPLC检测。结果表明, 三种亲和柱对12种磺胺类药物吸附的情况不同, 本实验目的是制备对12种磺胺类药物都能很好的吸附的亲合柱, 因此, 需要将三种免疫亲和柱混合装柱。

[0030] 6. 复合1AC特异性: 将三种抗体偶联的琼脂糖凝胶按照1:1:1体积混合装柱, 制备复合亲和柱。分别取100 ng的12种磺胺类药物标准溶液10.0 mL, 通过复合免疫亲和柱, 用10 mL纯水淋洗后, 用5.0 mL甲醇洗脱, 收集洗脱液, 用HPLC检测。该复合免疫亲和柱对12种磺胺类药物都有很好的特异性吸附。因此, 该免疫亲和柱可以应用于12种磺胺类药物的检测。

[0031] 7. 洗脱条件的确定: 本试验采用改变极性的洗脱方法, 采用有机溶剂甲醇降低溶液的极性, 甲醇洗脱能力强, 而其易于浓缩和HPLC的检测。随着甲醇浓度的增加, 洗脱率逐渐增大; 当用100%的甲醇洗脱时, 洗脱率达到100%。为了便于HPLC的检测和提高检测灵敏度, 所以选择纯甲醇作为洗脱液。随着甲醇体积的增加, 洗脱率逐渐增大; 当甲醇用量超过1.5 mL后, 洗脱率达到最大值100%。因此, 为了提高检测灵敏度, 实验选定洗脱液的体积为2 mL。

[0032] 8. 柱容量: 本实验采用饱和法计算柱容量, 即将超过理论容量的待测物使1AC饱和, 经洗涤和洗脱后测定。取含有5000 ng的磺胺间二甲氧嘧啶(过量)工作溶液10 mL, 通过免疫亲和柱, 用10 mL纯水淋洗后, 用2.0 mL甲醇洗脱, 收集洗脱液, 用HPLC检测。洗脱液中磺胺间二甲氧嘧啶的含量为2500 ng, 因此该免疫亲和柱的柱容量为2500 ng。

[0033] 9. 甲醇的耐受性试验: 将200 ng磺胺间二甲氧嘧啶分别溶解于10 mL一定比例的甲醇水溶液中(分别为5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%甲醇水和乙腈水), 分别通过1AC, 用10 mL纯水淋洗后, 2.0 mL甲醇洗脱并计算回收率。1AC能耐受甲醇含量小于20%的甲醇水溶液。因此, 我们进行样品净化实验, 上柱的样品提取液中甲醇的含量不能大于20%。

[0034] 采用获得的磺胺类三种抗体与溴化氰(CNBr)活化的琼脂糖(Sepharose 4B)进行偶联, 湿法装柱, 得到的三种1AC分别只能对3种, 8种和7种磺胺类药物有很好的特异性吸附; 本实验将三种偶联的琼脂糖凝胶按照体积1:1:1混合装柱, 制备复合亲和柱。对复合柱子的洗脱条件进行优化, 并对柱子的性能参数进行测试。柱子的洗脱条件为: 用2.0 mL甲醇洗脱, 柱性能测试结果为: 抗体的偶联率大于99%, 柱容量为2500 ng/g基质, 该复合1AC柱对

12种磺胺类药物都有很好的特异性吸附。

[0035] 三. 免疫亲和柱净化法同时测定动物源性食品中的多种磺胺类药物

1. 建立了同时检测猪肉、牛奶中12种磺胺类药物残留量的免疫亲和净化-超高效液相色谱法。样品经超声提取,磺胺类药物免疫亲和柱净化,选择性高,净化效果好,并以超高效液相色谱-PDA进行检测确证。结果表明:该方法简便、快速、灵敏、准确、净化效果好、回收率高,适用于猪肉和牛奶中12种磺胺类药物残留量的同时检测。

[0036] 2. 建立了同时检测猪肉、牛肉、牛奶和鸡蛋4种基质中12种磺胺类药物的免疫亲和柱-超高效液相色谱串联质谱法(1AC-UHPLC-MS/MS)。用Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18柱以甲醇和0.1%甲酸水溶液为流动相分离,质谱以正离子模式离子化,多反应监测(MRM)定量测定。样品用1AC-SULF免疫亲和柱净化,净化效果好,平均回收率在67%~107%之间,相对标准偏差低于10.0%。12种磺胺药物的定量限范围为2.3~10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ,方法具有较宽的线性范围,相关系数 $R^2 > 0.99$ ,适用于动物源性食品中多种磺胺类药物的同时检测。

[0037] 以上所述仅是本发明的较佳实施方式,故凡依本发明专利申请范围所述的构造、特征及原理所做的等效变化或修饰,均包括于本发明专利申请范围内。



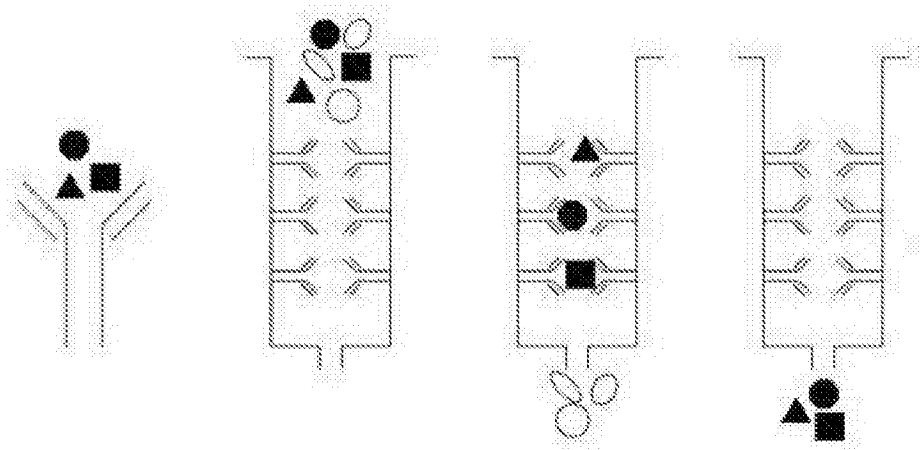


图1

专利名称(译)	一种免疫亲和柱的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106908597A</a>	公开(公告)日	2017-06-30
申请号	CN201710118407.8	申请日	2017-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	花锦		
申请(专利权)人(译)	花锦		
当前申请(专利权)人(译)	花锦		
[标]发明人	花锦		
发明人	花锦		
IPC分类号	G01N33/536 G01N30/02 G01N30/06		
CPC分类号	G01N33/536 G01N30/02 G01N30/06 G01N2030/062 G01N2030/126		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种免疫亲和柱的制备方法，主要由三种抗体和偶联基质偶联后湿法装柱获得三种免疫亲和柱，并按照体积1:1:1混合装柱，制备的一种复合亲和柱。其柱容量为2500 ng，净化效果好，可被重复利用3次，平均回收率在67%~107%之间。该复合免疫亲和柱至少对12种磺胺类药物都有很好的特异性吸附，包括：磺胺嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噻唑、磺胺异噻唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪钠、磺胺间甲氧嘧啶。制备得到这种偶联率高、特异性吸附性强、柱容量和回收率高的免疫亲和柱，并提出可同时检测上述12种磺胺类药物残留的灵敏、快速、简便的分析方法。

