



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102087278 A

(43) 申请公布日 2011.06.08

(21) 申请号 201010600992.3

(22) 申请日 2010.12.23

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 王利兵 胥传来 宋珊珊 林菲
赵书阁 刘微波 赵媛

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/14 (2006.01)

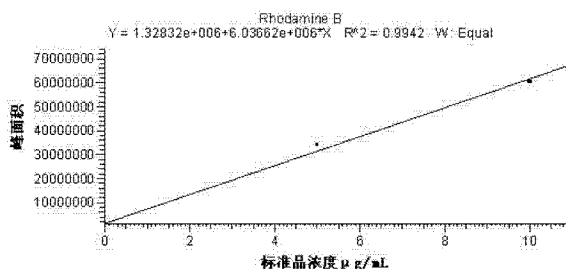
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

罗丹明 B 的免疫亲和柱 - 高效液相 - 质谱联用检测方法

(57) 摘要

罗丹明 B 的免疫亲和柱 - 高效液相 - 质谱联用检测方法, 属于免疫学检测技术领域。本发明以抗罗丹明 B 的抗体与四甲氧基硅烷(TMOS)偶联包埋于层析柱中, 通过吸附、洗脱达到样品净化的效果, 再进行高效液相 - 质谱联用检测。本发明方法可以简化罗丹明 B 残留检测的样品处理过程, 同时可达到净化浓缩的效果, 成本低廉, 快速, 便携。



1. 一种罗丹明 B 的免疫亲和柱 - 高效液相 - 质谱联用检测方法,其特征以抗罗丹明 B 的抗体与四甲氧基硅烷 TMOS 偶联包埋于层析柱中,通过吸附、洗脱达到样品净化的效果,最后通过高效液相 - 质谱联用检测;

A、罗丹明 B 的免疫亲和柱的制备,步骤为:

(1)取 0.2mL 的 0.04mol/L HCl 溶液,0.75mL 的去离子水,3.4mL 的四甲氧基硅烷 TMOS 混匀,4℃保存 2-3min;取出,超声粉碎 30min;

(2)取一质量已知的烧杯,吸取 20 μ L 罗丹明 B 抗体,用 pH7.4、0.01mol/L PBS 稀释至 1mL,得罗丹明 B 抗体溶液,4℃保存;

(3)取步骤(1)超声完全后的混合液,吸取其中 1mL 试样,加入罗丹明 B 抗体溶液中,混匀,使之凝胶;

(4)待凝胶结束后,烧杯称重,置于 37℃恒温烘箱凝胶老化,待凝胶失去初重的 50% 时,老化过程结束,将 1g 老化后的凝胶研磨粉碎,装柱;

(5)待柱中凝胶沉积稳定后,用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 预淋洗,洗去未包埋的罗丹明 B 抗体和其他干扰杂质,最后用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 平衡,即制得罗丹明 B 的免疫亲和柱;

B、罗丹明 B 的免疫亲和柱的吸附、洗脱:

平衡:10mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS;

上样:待测的样品溶液;

洗涤:用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤;

洗脱:5mL 甲醇洗脱,收集洗脱液待测;

C、高效液相 - 质谱联用检测,步骤为:

(1)以一定水平的罗丹明 B 加入辣椒粉样品中,在室温下至少静置 15 min;

(2)取上述添加罗丹明 B 的辣椒粉样品 1g,加入 10mL 含体积百分 20% 丙酮的正己烷,震荡 10 min,静置、过滤使分离出上层清液,残渣加入 10mL 含体积百分 20% 丙酮的正己烷重复提取一次,合并 2 次提取液,混匀;

(3)移取提取液于氮吹仪上吹干,用 0.01M PBS 重溶,吹干后的样品用 0.01M PBS 以质量计稀释 10 倍;

(4)用 10mL 0.01M PBS 平衡免疫亲和柱;

(5)加样,用 5mL 0.01M PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤,洗去未吸附样品;

(6)5mL 甲醇溶液洗脱柱上样品,收集洗脱液;

(7)洗脱液经 0.22 μ m 孔径的聚四氟乙烯膜过滤后进行高效液相 - 质谱联用检测。

罗丹明 B 的免疫亲和柱 – 高效液相 – 质谱联用检测方法

技术领域

[0001] 罗丹明 B 的免疫亲和柱 – 高效液相 – 质谱联用检测方法,具体涉及到免疫层析柱的制备及实际样品检测,属于免疫学检测技术领域。

背景技术

[0002] 近年来苏丹红,孔雀石绿事件给我国食品出口贸易带来很大问题,造成我方的很大被动。像苏丹红本为工业染料,而非食品添加剂色素。但一些不法商人为了牟取高额利润不顾消费者的健康问题,在食品中非法添加这些成本低、色彩鲜艳的工业染料。2008 年卫生部发布《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单(第一批)》,明确规定苏丹红、碱性橙、酸性橙、罗丹明 B 类工业染料禁止在食品中添加。所以食品中违禁色素一直是食品安全检测的重点。目前对违禁色素的检测主要侧重在仪器分析,对免疫分析涉及很少。免疫分析基于抗原抗体免疫反应的特异性较于仪器分析其特异性强、灵敏度高,不仅可以大大简化甚至可以省去样品前处理的复杂过程,而且避免了因大量使用溶剂而对环境的污染,再而免疫分析一般不需贵重仪器,具便携性,不需要专门的技术人员,便于推广。因此对违禁色素的免疫分析研究是必不可少的。

发明内容

[0003] 本发明的目的是为了克服现有检测技术的缺陷,建立一种方便快捷的样品处理方法,并在此基础上建立罗丹明 B 的检测方法。

[0004] 本发明的技术方案:一种罗丹明 B 的免疫亲和柱 – 高效液相 – 质谱联用检测方法,以抗罗丹明 B 的抗体与四甲氧基硅烷 TMOS 偶联包埋于层析柱中,通过吸附、洗脱达到样品净化的效果,最后通过高效液相 – 质谱联用检测;

1、罗丹明 B 免疫亲和柱的制备,步骤为:

(1)取 0.2mL 的 0.04mol/L HCl 溶液,0.75mL 的去离子水,3.4mL 的 TMOS (四甲氧基硅烷)混匀。4℃保存 2-3min;取出,超声粉碎 30min;

(2)取一质量已知的烧杯,吸取 20 μ L 罗丹明 B 抗体溶液,用 PBS (0.01mol/L、pH7.4)稀释至 1mL,得罗丹明 B 抗体溶液,4℃保存。

[0005] (3)取步骤(1)超声完全后的混合液,吸取其中 1mL 试样,加入罗丹明 B 抗体溶液中,混匀,使之凝胶。

[0006] (4)待凝胶结束后,烧杯称重,置于 37℃恒温烘箱凝胶老化,待凝胶失去初重的 50% 时,老化过程结束,将老化后的凝胶(约 1g)研磨粉碎,装柱。

[0007] (5)待柱中凝胶沉积稳定后,用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 预淋洗,洗去未包埋的罗丹明 B 抗体和其他干扰杂质,最后用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 平衡,即制得罗丹明 B 的免疫亲和柱。

[0008] 2、罗丹明 B 免疫亲和柱的吸附、洗脱:

平衡:10mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS;

上样 :待测的样品溶液 ;

洗涤 :用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤 ;

洗脱 :5mL 甲醇洗脱,收集洗脱液待测。

[0009] 3、高效液相 - 质谱联用检测,步骤为 :

(1) 以一定水平的罗丹明 B 加入辣椒粉样品中,在室温下至少静置 15 min ;

(2) 取上述添加罗丹明 B 的辣椒粉样品 1g,加入 10mL 含体积百分 20% 丙酮的正己烷,震荡 10 min,静置、过滤使分离出上层清液,残渣加入 10mL 含体积百分 20% 丙酮的正己烷重复提取一次,合并 2 次提取液,混匀 ;

(3) 移取提取液于氮吹仪上吹干,用 0.01M PBS 重溶,吹干后的样品用 0.01M PBS 以质量计稀释 10 倍 ;

(4) 用 10mL 0.01M PBS 平衡免疫亲和柱 ;

(5) 加样,用 5mL 0.01M PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤,洗去未吸附样品 ;

(6) 5mL 甲醇溶液洗脱柱上样品,收集洗脱液 ;

(7) 洗脱液经 0.22 μ m 孔径的聚四氟乙烯膜过滤后进行高效液相 - 质谱联用检测。

[0010] 本发明的有益效果 :本发明方法可以简化罗丹明 B 残留检测的样品处理过程,同时可达到净化浓缩的效果,成本低廉,快速,便携。

附图说明

[0011] 图 1 罗丹明 B 标准溶液质谱标准曲线图。

具体实施方案

[0012] 1、罗丹明 B 免疫亲和柱的制备 :

(1) 取 0.2mL 的 0.04mol/LHCl 溶液,0.75mL 的去离子水,3.4mL 的 TMOS (四甲氧基硅烷) 混匀。4° C 保存 2-3min ;取出,超声粉碎 30min ;

(2) 取一质量已知的烧杯,吸取 20 μ L 罗丹明 B 抗体溶液,用 PBS (0.01mol/L、pH7.4) 稀释至 1mL,得罗丹明 B 抗体溶液,4° C 保存。

[0013] (3) 取步骤(1) 超声完全后的混合液,吸取其中 1mL 试样,加入罗丹明 B 抗体溶液中,混匀,使之凝胶。

[0014] (4) 待凝胶结束后,烧杯称重,置于 37° C 恒温烘箱凝胶老化,待凝胶失去初重的 50% 时,老化过程结束,将老化后的凝胶(约 1g) 研磨粉碎,装柱。

[0015] (5) 待柱中凝胶沉积稳定后,用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 预淋洗,洗去未包埋的罗丹明 B 抗体和其他干扰杂质,最后用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 平衡,即制得罗丹明 B 的免疫亲和柱。

[0016] 2、罗丹明 B 免疫亲和柱的吸附、洗脱 :

平衡 :10mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS ;

上样 :待测的样品溶液 ;

洗涤 :用 5mL pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤 ;

洗脱 :5mL 甲醇洗脱,收集洗脱液待测。

[0017] 3、高效液相 - 质谱联用检测,步骤为 :

取辣椒粉 1g 于 50mL 离心管中,加一定浓度的罗丹明标准品,震荡混匀。加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷,震荡 10min,静置或过滤使分离出上层清液,残渣加入 10mL 含 20% 丙酮的正己烷重复提取一次,合并 2 次提取液,混匀。于氮吹仪上吹干,用 0.01M PBS 重溶,样品用 0.01M PBS 稀释 10 倍,得样品提取液。用 10mL PBS 平衡免疫亲和柱柱后,加样,用 5mL PBS 洗涤,再用 5mL 超纯水洗涤,洗去未吸附样品。5mL 甲醇溶液洗脱柱上样品,收集洗脱液,洗脱液经 0.22 μm 孔径的聚四氟乙烯膜过滤后进行高效液相-质谱联用检测。

[0018] 4、试验结果如下:

(1) 免疫亲和柱偶联率

罗丹明 B 多克隆抗体与四甲氧基硅烷偶联后,用 PBS 多次淋洗,洗去未偶联上的罗丹明 B 抗体,收集洗涤液,通过紫外测定计算偶联率如表 1。

[0019] 表 1 抗体偶联率

	抗体量 (μg)	偶联率 (%)
抗体总量	40	—
偶联的抗体	33.1	82.7
未偶联的抗体	6.9	17.3

(2) 柱容量及重复性绝对柱容量为免疫柱中活性抗体的总量,一般用免疫柱对抗原的最大吸附量来表示。本实施例加入的抗体量为 40 μg ,偶联上的活性抗体量为 33.1 μg ,抗体的相对分子量通常认为 $1.5 \times 10^5 \text{Da}$,理想条件下每个抗体可以结合 2 个抗原,因此计算的偶联了 33.1 μg 罗丹明 B 抗体的免疫亲和柱的柱容量为 211ng 的罗丹明 B。

[0020] 实施例中的洗脱液为甲醇,而甲醇对抗体有破坏作用,所以每次用完的免疫亲和柱都需要用 PBS 恢复,4 次使用后其柱容量便降低到 30ng 的罗丹明 B。但本实施例的目的是建立罗丹明 B 的痕量残留检测,所以至少能够重复使用 4 次。

[0021] (3) 添加回收

表 2 添加回收率及重复性测试

样品	添加水平 (ng/g)	回收率 (%)	变异系数 (%)	
			批内差异 (n=5)	批间差异 (n=3)
辣椒粉	1	65.4-71.7	7.5 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.3
	5	90.2-95.3	6.0 $\pm$ 0.1	7.3 $\pm$ 0.2

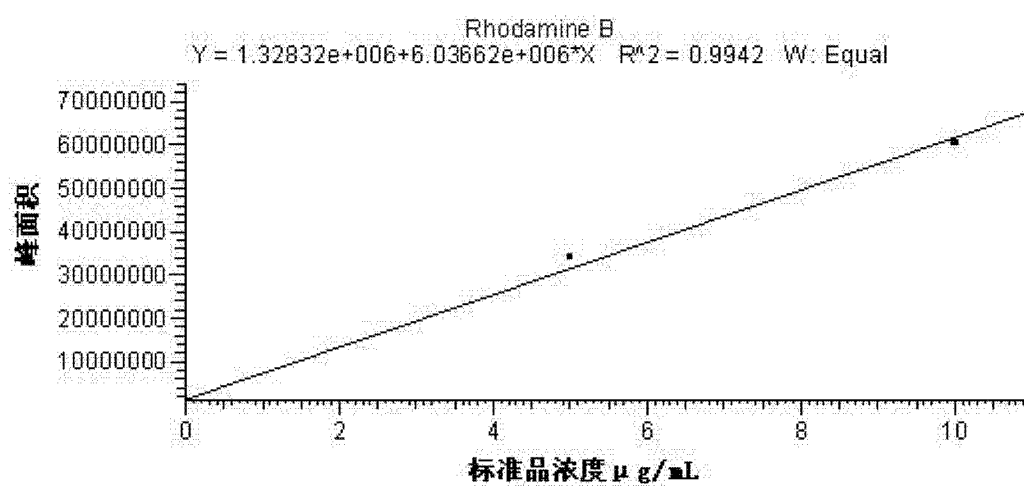


图 1

专利名称(译)	罗丹明B的免疫亲和柱-高效液相-质谱联用检测方法		
公开(公告)号	CN102087278A	公开(公告)日	2011-06-08
申请号	CN201010600992.3	申请日	2010-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	王利兵 胥传来 宋珊珊 林菲 赵书阁 刘微波 赵媛		
发明人	王利兵 胥传来 宋珊珊 林菲 赵书阁 刘微波 赵媛		
IPC分类号	G01N33/53 G01N30/72 G01N30/14		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

罗丹明B的免疫亲和柱-高效液相-质谱联用检测方法，属于免疫学检测技术领域。本发明以抗罗丹明B的抗体与四甲氧基硅烷（TMOS）偶联包埋于层析柱中，通过吸附、洗脱达到样品净化的效果，再进行高效液相-质谱联用检测。本发明方法可以简化罗丹明B残留检测的样品处理过程，同时可达到净化浓缩的效果，成本低廉，快速，便携。

