

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/559 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510086345.4

[45] 授权公告日 2007 年 6 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 1323295C

[22] 申请日 2005.9.2

[21] 申请号 200510086345.4

[73] 专利权人 王家红

地址 100050 北京市宣武区天桥北里 7 号
楼 3 单元 602

[72] 发明人 张 珙 王家红

[56] 参考文献

CN1547021A 2004.11.17

JP5 - 168475A 1993.7.2

CN1482455A 2004.3.17

氯霉素分子烙印固相萃取柱的制备及萃取
条件优化 陈小霞等, 华南理工大学学报(自然
科学版), 第 32 卷第 7 期 2004

审查员 邢维玲

[74] 专利代理机构 北京市商泰律师事务所
代理人 谷胜斌 毛燕生

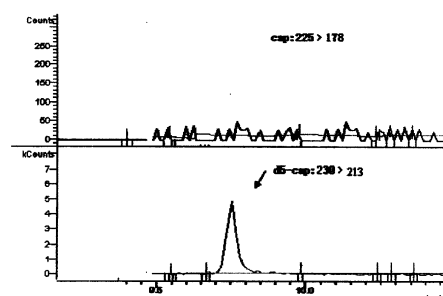
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 4 页

[54] 发明名称

氯霉素亲和柱及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及一种氯霉素亲和柱及其制备方法和用途, 其采用蛋白 A 琼脂糖凝胶 (protein A - Sepharose 4 fast flow) 作为固相载体, 载体上的蛋白 A 与氯霉素抗体相偶联, 偶联后的氯霉素抗体又与固定相化学键合, 该亲和柱制备方法简单, 可重复使用的, 提高了富集和净化的效率, 从而提高了方法的灵敏度, 理论上可以适用多种基质, 由于使用了蛋白 A, 所以只有 IgG 可以联结, 偶联的特异性高, 柱子的氯霉素负载量大, 即使使用纯溶剂也可以多次重复使用。



1. 一种氯霉素亲和柱的制备方法，其特征在于：

(1) 将氯霉素多克隆免疫血清抗体经过硫酸铵分级沉淀纯化后和 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液混合；

(2) 将蛋白 A 琼脂糖凝胶与 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液混合；

(3) 将 (1) 与 (2) 混合，室温，振荡 1-3 小时，蛋白 A 琼脂糖凝胶:氯霉素多克隆免疫血清抗体:0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液按体积 1:1:3 配比；

(4) 待氯霉素多克隆免疫血清抗体与蛋白 A 琼脂糖凝胶特异性结合后，分别用 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 0.2 mol/L, pH8.2 的三乙醇胺溶液洗去未结合的抗体和杂蛋白；

(5) 然后加入 0.2 mol/L, pH8.2 的三乙醇胺溶液和二甲基庚二酸酯，室温，振荡 1-2 小时，三乙醇胺溶液:氯霉素多克隆免疫血清抗体:蛋白 A 琼脂糖凝胶按体积 1:1:1 配比，三乙醇胺溶液:二甲基庚二酸酯按 1ml:5mg 配比；

(6) 用 0.02mol/L, pH7.4 的乙醇胺溶液终止联接反应后，换含 0.01% 柳硫汞钠的 0.01 mol/L, pH7.4, 磷酸盐缓冲液置换柱内液体，装柱，0.25ml/柱，4℃保存。

2. 根据权利要求 1 所述的氯霉素亲和柱的制备方法制备的氯霉素亲和柱，其特征在于：由蛋白 A 琼脂糖凝胶作为固相载体，载体上的蛋白 A 与氯霉素抗体相偶联，偶联后的氯霉素抗体又与固相载体的

化学键结合。

3. 根据权利要求 2 所述的氯霉素亲和柱的用途, 其特征在于: 用于蜂蜜、水产或动物组织氯霉素残留的测定及饲料、血液或尿样当中氯霉素的测定。

4. 根据权利要求 2 所述的氯霉素亲和柱的使用方法, 其特征在于:

(1) 放掉柱内溶液, 分别用 0.01 mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS) 和 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床;

(2) 将提取的样品用 0.3M, pH8.0 的磷酸钾缓冲液溶解、上样;

(3) 淋洗溶液: 依次用水和甲醇-水, 甲醇: 水=20: 80 淋洗柱床、弃去;

(4) 洗脱溶液: 用 100%甲醇作为洗脱溶剂洗脱并测定洗脱液;

(5) 活化再生: 100%甲醇淋洗, 用 0.01 mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS) 活化再生;

(6) 保存条件: 用含 0.01%柳硫汞钠的 0.01 mol/L, pH7.4, 磷酸盐缓冲液置换柱内液体, 4℃保存, 以待重复使用。

氯霉素亲和柱及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种采用蛋白 A 琼脂糖凝胶(protein A-Sepharose 4 fast flow)作为固相载体,与氯霉素的多克隆抗体(兔)相偶联制备可重复使用的氯霉素亲和柱及其制备方法和用途,代替样品前处理中传统的固相萃取技术净化样品,提高富集和净化的效率。

背景技术

氯霉素由于其具有疗效好、价格低廉等优点,曾经广泛应用于各类家禽、家畜、水产品及蜂制品疾病的控制和治疗。但氯霉素同时存在严重的副作用,尤其是非剂量依赖的引起不可逆的再生障碍性贫血,引起了国际组织和各国的高度重视,纷纷制定严格的计划进行控制。鉴于此,包括我国在内的许多国家都对动物性食品中氯霉素的残留作了严格的限制,规定不得检出。氯霉素的残留同时也成为国际贸易中的技术壁垒,检测的限量标准一降再降,欧盟的现行标准为 0.3 $\mu\text{g/Kg}$ 。目前,氯霉素的筛选方法较多的是采用酶联免疫吸附测定法(ELISA),确证主要采用液相色谱-质谱联用(LC/MS/MS)和气相色谱-质谱联用(GC/MS)。在仪器测定中,往往需要复杂的样品净化技术。传统的净化技术包括液液萃取、基质固相分散和固相萃取等。液液萃取的净化方式,一般首先用乙酸乙酯提取浓缩后,用 0.4%的氯化钠溶液溶解,再采用正己烷液液萃取除掉油脂,之后用乙酸乙酯

反萃取进行浓缩，之后进行分析，该种净化方式测定的检测限不低于 $10\mu\text{g/Kg}$ ，不能满足目前的检出要求；为了追求高的灵敏度，还需要进一步的净化，通常的方式是采取 C_{18} 柱或类似其它的固相萃取柱净化，有的报道采用两根以上的固相萃取柱连续净化，可以达到检测要求，但是由于基质的差异，针对不同的样品往往需要采用不同的净化方式以除去不同性质的干扰物质；有研究使用氯霉素抗体与凝胶固相载体相联制备亲和层析柱，该方法特异性高，净化富集的效果好，目前已有产品上市，但是目前的偶联方式是采用抗体通过 CNBr 与凝胶固相载体联结，这种方式决定了其对抗体的纯度要求较高，否则杂蛋白的存在会影响测定结果、同时影响了柱的氯霉素负载量，而且可重复使用的次数有限，有些开发为一次性的亲和层析柱，这样成本较一般的固相萃取柱成本高出很多，而可以重复使用的产品对于溶剂的使用要求严格，一般禁止使用纯溶剂，这样就存在洗脱残留造成的假阳性结果。

发明内容

本发明的目的是采用蛋白 A 琼脂糖凝胶（protein A-Sepharose 4 fast flow）作为固相载体，与经过硫酸铵盐析纯化的氯霉素多克隆抗体（兔抗）相偶联制备可重复使用的亲和层析柱，代替样品前处理中传统的固相萃取技术净化样品，提高富集和净化的效率，提高方法的灵敏度，同时该亲和层析柱理论上可以适用多种基质。

本发明的技术方案如下：

亲和柱的制备：

- (1) 将氯霉素多克隆免疫血清抗体经过硫酸铵分级沉淀纯化后和 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液混合;
- (2) 将蛋白 A 琼脂糖凝胶与 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液混合;
- (3) 将 (1) 与 (2) 混合, 室温, 振荡 1-3 小时, 蛋白 A 琼脂糖凝胶:氯霉素多克隆免疫血清抗体:0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液按体积 1:1:3 配比;
- (4) 待氯霉素多克隆免疫血清抗体与蛋白 A 琼脂糖凝胶特异性结合后, 分别用 0.01mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液和 0.2 mol/L, pH8.2 的三乙醇胺溶液洗去未结合的抗体和杂蛋白;
- (5) 然后加入 0.2 mol/L, pH8.2 的三乙醇胺溶液和二甲基庚二酸酯 (DMP), 室温, 振荡 1-2 小时, 三乙醇胺溶液:氯霉素多克隆免疫血清抗体:蛋白 A 琼脂糖凝胶按体积 1:1:1 配比, 三乙醇胺溶液:二甲基庚二酸酯按 1ml:5mg 配比;
- (6) 用 0.02mol/L, pH7.4 的乙醇胺溶液终止联接反应后, 换含 0.01% 柳硫汞钠的 0.01 mol/L, pH7.4, 磷酸盐缓冲液置换柱内液体, 装柱, 0.25ml/柱, 4℃ 保存。

氯霉素免疫亲和柱的使用方法:

将制备好的氯霉素免疫亲和柱从 4℃ 冰箱中取出, 室温中放置 2 小时使用。

上样: 放掉柱内溶液, 分别用 0.01 mol/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 和 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床; 将提取的样品用 0.3M, pH8.0 的磷酸钾缓冲液溶解、上样;

淋洗溶液：依次用水和甲醇-水，甲醇：水=20：80 淋洗柱床、弃去；

洗脱溶液：用 100%甲醇洗脱用于测定；

活化再生：100%甲醇淋洗，用 0.01 mol/L，pH7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）活化再生；

保存条件：用含 0.01%柳硫汞钠的 0.01 mol/L，pH7.4，磷酸盐缓冲液置换柱内液体，4℃保存，以待重复使用。

适用范围：可用于蜂蜜、水产、动物组织氯霉素残留的测定以及饲料、血液和尿样当中氯霉素的测定。

亲和柱性能的评价：包括柱容量、柱空白、柱回收、柱重复性和稳定性。柱容量：采用过量的氯霉素通过亲和柱，测定柱内的氯霉素决定其柱容量。柱空白：选择经过柱容量测定的亲和柱，采用上样溶液通过亲和柱，经过淋洗、洗脱后测定洗脱液中的氯霉素。柱回收：20ng 氯霉素通过亲和柱，经过淋洗、洗脱后测定洗脱液中的氯霉素。柱重复性和稳定性：以测定食品实际样品的结果来表示。氯霉素的含量通过 N，O-双（三甲基硅烷基）三氟乙酰胺（BSTFA）+三甲基氯硅烷（TMCS）（99：1）衍生，然后采用 GC-MS/MS 进行测定。氯霉素的衍生原理、衍生物的全扫描质谱图和二级质谱图分别见图 1、图 2 和图 3。

柱容量：将制备好的氯霉素免疫亲和柱从 4℃冰箱中取出，室温中放置 2 小时进行测试。放掉柱内溶液，分别用 10ml 磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH7.4）和 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床；

0.3M 磷酸钾缓冲液 10ml, 加入 54ng 氯霉素标准, 混匀, 上样; 自然流速收集上样溶液; 再分别用 1ml 水和 2ml 甲醇-水 (20: 80) 淋洗弃去, 2ml 甲醇洗脱并收集; 4ml 甲醇淋洗, 10ml 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH7.4) 活化, 换液 PBS-0.01%, 4℃保存。各收集管中加入 5ng 的内标 (d_5 -氯霉素); 收集的上样溶液用乙酸乙酯 40ml 萃取并浓缩, 最终各收集管用氮气吹干, 加入 100 μ l 乙酸乙酯和 100 μ l BSTFA+TMCS (99:1), 同标准一起在 75℃反应 30 分钟进行衍生, 氮气吹干, 加入 100 μ l 乙酸乙酯定容, 进行 GC-MS 分析。标准系列 取不同浓度 Cap 系列标准溶液及 50 μ L, 100 μ g/ L d_5 -Cap 内标溶液(100 μ g/ L, 50 μ g/ L, 20 μ g/ L, 10 μ g/ L, 5 μ g/ L, 2 μ g/ L), N_2 流下吹干, 同上述衍生操作步骤。

GC-MS 分析条件:

色谱条件: 载气: 高纯氮气; 恒压: 10 psi; 进样口温度 260℃; 初始柱温 150℃, 保持 1 min, 20℃/min 升至 270℃, 保持 5min。传输线温度: 250℃; 进样方式: 不分流进样 1 μ L。

质谱参数: 灯丝电流: 50 μ A, 离子化方式: 电子轰击源, 离子制备: 多反应监测 (MRM); 溶剂延迟: 8.5min; 阱温: 220℃; 倍增器补偿电压: 250V ; 扫描时间: 0.4s; 最大离子化时间: 65000 μ s; 阱内目标离子数: 5000 counts; 预扫描时间: 1500 μ s; 碰撞诱导电位: 0.4V 。 Cap 及 d_5 -Cap 监测离子分别为: m/z 225 > 208、178 、 m/z 230 > 213。

定量计算

以各系列标准溶液的进样量 (ng) 与对应的氯霉素 (m/z208) 和内标(m/z213)的峰面积比进行线性回归计算, 得出线性方程为:

按下式用内标法计算样品中 AA 的含量。

$$X = \frac{A \times m_2}{m_1 \times m_3}$$

X- 试样中 AA 含量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

A-试样色谱峰与内标色谱峰的峰面积比值对应的氯霉素质量, ng;

m1-取样量, g;

m2-标准溶液中标的质量, ng;

m3- 样品中内标的质量, ng。

计算结果保留三位有效数字。

柱容量的测定结果见表 1, 由表 1 可以看出该免疫亲和柱的柱容量不小于 45ng。对于氯霉素的检测, 各国的规定均 $< 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$, 所以该亲和柱的柱容量完全满足样品分析的容量要求。亲和柱的制备日期为 2004-10-18, 截止 2005-3-14 共 5 个月的保存时间, 重复使用次数不小于 40 次的情况下, 其柱容量不低于 40ng, 而对于氯霉素残留的检测, 10ng 的柱容量已经足够。

表 1 柱容量测定结果

柱号	上样液含量 (ng)	洗脱液含量 (ng)
1	6.4	47.4
2	ND	55.8

柱空白：测试过程同柱容量，不同处为 1) 不上标准；2) 只收集洗脱液（2ml 甲醇）

柱空白的测定为 ND，其色谱图见图 4，该方法的检出限为 2pg，定容体积为 100 μ l，则柱空白不大于 200pg。

柱回收：测试过程同柱容量，不同处为 1) 将标准量改为 20ng，因为考虑到各国制定的标准均 < 1 μ g/Kg，而目前测定方法的取样量一般 $\leq$ 10g；2) 只收集洗脱液（2ml 甲醇）。

柱回收结果：同一根亲和柱测定四次结果为 85-96%之间。结果显示亲和柱的回收率可以满足分析方法的要求。

重复性和稳定性

亲和柱的重复性和稳定性以测定食品中基质复杂的蜂蜜样品的加标回收来表示，加标的水平分别为 0.1、0.3 和 1.0 μ g/Kg。

提取：称取蜂蜜样品 5g，加入 10ml 超纯水，振荡溶解；加入 25ml 乙酸乙酯振荡提取 30 分钟，3500rpm 离心 5 分钟，滴管转移上层有机相，重复乙酸乙酯提取过程合并有机相；加入 5ml 0.3M 磷酸钾缓冲液，45℃减压旋转蒸发至瓶口出现水雾；蒸发残留物溶解在 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液中过亲和柱。

净化及 GC-MS 测定见柱容量。

重复性和稳定性实验结果：蜂蜜样品的加标结果见表 2，测定的三个水平的回收率在 80-90%之间，RSD 在 0.1 μ g/Kg 水平为 14.4%，其余两个水平均小于 10%。结果表明该方法测定蜂蜜中的氯霉素可以满足分析方法的要求。蜂蜜的空白样品含量 < 0.1 μ g/Kg，将取样量扩

大到 10g 平行测定 6 次，结果为 0.05 ± 0.01 ，RSD20%。亲和柱蜂蜜样品 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 加标的质量色谱图见图 5，其信噪比为 8-14，达到定量检出的要求， m/z 208 和 178 丰度比分别为 100%、13%，与标准的丰度相比误差 $<20\%$ ，满足分析要求。

表 2 蜂蜜样品的加标结果

加标水平 ($\mu\text{g/Kg}$)	加标前含量 ($\mu\text{g/Kg}$)	测定均值 ($\mu\text{g/Kg}$)	回收率 (%)	RSD (%)
0.1(n=5)	0.05	0.1375	87.5	14.4
0.3(n=6)	0.05	0.303	84.2	5.9
1.0(n=6)	0.05	0.948	89.8	7.9

与 C_{18} 柱净化结果的比较：

以目前最常用 Sep-pak C_{18} 柱净化蜂蜜样品进行二者净化效果的比对，加标的水平分别为 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 和 $0.3 \mu\text{g/Kg}$

提取过程类似亲和柱，但将内标在提取前加入，并将最终的定溶液改为 4mL 乙腈/水 (5/95, V/V)

净化：先按下述过程活化 Sep-pak C_{18} 柱：依次用 5mL 甲醇、5mL 三氯甲烷、5mL 甲醇、10mL 水淋洗。将样品提取液上活化后的 SPE C_{18} 柱，用 5 mL 乙腈/水 (5/95) 淋洗后，用 3 mL 乙腈/乙酸乙酯 (98/2) 洗脱，收集洗脱液，在 N_2 流下吹干。

衍生和测定同亲和柱。

Sep-pak C_{18} 柱的测定结果为加标水平为 $0.3 \mu\text{g/Kg}$ (n=6) 时，回收率 $111\% \pm 1.06$ ，RSD 为 6.98%。加标水平为 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 时，其信噪比

只有 3-5，不足以达到定量检出的要求。比较二者 $0.3 \mu\text{g/Kg}$ 的加标结果，回收率和 RSD 没有显著性差别，二者的质量色谱图均没有杂峰干扰，但背景的离子化时间有明显的区别，而离子化时间与阱中的离子数成反比反应了背景的干净程度它，离子化时间越长说明背景越干净。亲和柱净化的样品背景离子化时间均不小于 $45000\mu\text{s}$ ，Sep-pak C_{18} 柱净化的样品背景离子化时间均不大于 $20000\mu\text{s}$ 。说明亲和层析柱净化效果优于 C_{18} 柱，虽然在测定蜂蜜时 $0.3 \mu\text{g/Kg}$ 的加标水平下两种处理方式均能满足分析要求，但在 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 加标水平下测定结果明显优于 C_{18} ，而且可以预测面对基质更复杂的样品相对于 C_{18} 柱本方法会有更好的净化效果。

该亲和层析柱提高了富集和净化的效率，从而提高了方法的灵敏度，理论上可以适用多种基质，该技术由于使用了蛋白 A 所以只有 IgG 可以联结，偶联的特异性高，柱子的氯霉素负载量大，即使使用纯溶剂也可以多次重复使用。

附图说明

图 1 氯霉素衍生原理

图 2 氯霉素衍生物的全扫描质谱图

图 3 氯霉素衍生物 MS/MS 质谱图

图 4 柱空白的质量色谱图

图 5 亲和柱蜂蜜样品 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 加标的质量色谱图

具体实施方式

实施例 1

本实施例是氯霉素免疫亲和柱的制备。

所用试剂

氯霉素多克隆抗体：BSA-琥珀氯霉素免疫家兔，免疫血清经过硫酸铵沉淀纯化（蛋白浓度 5mg/ml）；蛋白 A 琼脂糖凝胶（Pharmacia Biotech）；二甲基庚二酸酯（Pierce Bitotechnology, DMP）；甲醇、乙醇胺、三乙醇胺、柳硫汞钠、NaCl、KCL、 KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 。

缓冲液的配置

0.3M 磷酸钾缓冲液，pH8.0：64.8g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，蒸馏水溶解定容至 1000ml，磷酸调节 pH8.2；0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.4）：NaCl 8.00g，KCL 0.2g， KH_2PO_4 0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.90g，蒸馏水溶解定容至 1000ml；含 0.01%柳硫汞钠的磷酸盐缓冲液（PBS-0.01%）；0.2 mol/L 三乙醇胺溶液(pH8.2)：三乙醇胺 5.968g 蒸馏水溶解定容至 200ml，磷酸调节 pH8.2；0.02mol/L 乙醇胺溶液(pH7.4)：用 0.2 mol/L 三乙醇胺溶液新鲜配置。

亲和柱的制备：

取 1ml 蛋白 A 琼脂糖凝胶微珠，3000rpm 离心 2 分钟，倒掉上清，加入 2ml PBS 轻轻混匀后 3000rpm 离心 2 分钟，倒掉上清液，重复两次；加入氯霉素抗体 1ml 和 1ml PBS 室温振荡 2 小时；PBS 洗三遍，每次 2ml，三乙醇胺溶液洗两遍，每次 2ml；3000rpm 离心 2 分钟，倒掉上清，加入 1ml 三乙醇胺溶液和 5mgDMP，室温振荡 1 小时；3000rpm 离心 2 分钟，倒掉上清，乙醇胺溶液洗两遍，换液

PBS-0.01%；装柱，0.25ml/柱，4℃保存。

氯霉素免疫亲和柱用于蜂蜜、水产、动物组织氯霉素残留的测定以及饲料、血液和尿样当中氯霉素的测定。

将制备好的氯霉素免疫亲和柱从 4℃冰箱中取出，室温中放置 2 小时使用。

上样：放掉柱内溶液，分别用 10ml 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH7.4) 和 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床；将提取的样品用 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液 (pH8.0) 溶解、上样。

淋洗溶液：依次 1ml 水和 2ml 甲醇-水（甲醇：水=20：80）淋洗柱床、弃去；

洗脱溶液：2ml 100% 甲醇洗脱用于测定；

活化再生：4ml 100% 甲醇淋洗，用 10ml 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH7.4) 活化再生；

保存条件：0.01% 柳硫汞钠的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH7.4)，4℃保存。

实施例 2

用实施例 1 所述的方法制备氯霉素免疫亲和柱，重复使用亲和柱，测定食品中基质复杂的蜂蜜样品的加标回收，加标的水平分别为 0.1、0.3 和 1.0 $\mu\text{g/Kg}$ 。

提取：称取蜂蜜样品 5g，加入 10ml 超纯水，振荡溶解；加入 25ml 乙酸乙酯振荡提取 30 分钟，3500rpm 离心 5 分钟，滴管转移上层有机相，重复乙酸乙酯提取过程合并有机相；加入 5ml 0.3M 磷酸钾缓

冲液，45℃减压旋转蒸发至瓶口出现水雾；蒸发残留物溶解在 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液中过亲和柱。

净化：将制备好的氯霉素免疫亲和柱从 4℃冰箱中取出，室温中放置 2 小时后进行测定。放掉柱内溶液，分别用 10ml 磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH7.4）和 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床；样品提取物上样；自然流速，弃取上样溶液；再分别用 1ml 水和 2ml 甲醇-水（20：80）淋洗弃去，2ml 甲醇洗脱并收集；4ml 甲醇淋洗，10ml 磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH7.4）活化，换液 PBS-0.01%，4℃保存。各收集管中加入 5ng 的内标（d₅-氯霉素）；最终用氮气吹干，加入 100 μl 乙酸乙酯和 100 μl BSTFA+TMCS (99:1)，同标准一起在 75℃反应 30 分钟进行衍生，氮气吹干，加入 100 μl 乙酸乙酯定容，进行 GC-MS 分析。

GC-MS 分析条件：

色谱条件：载气：高纯氮气；恒压：10 psi；进样口温度 260℃；初始柱温 150℃，保持 1 min，20℃/min 升至 270℃，保持 5min。传输线温度：250℃；进样方式：不分流进样 1μL。

质谱参数：灯丝电流：50 μA，离子化方式：电子轰击源，离子制备：多反应监测（MRM）；溶剂延迟：8.5min；阱温：220℃；倍增器补偿电压：250V；扫描时间：0.4s；最大离子化时间：65000 μs；阱内目标离子数：5000 counts；预扫描时间：1500 μs；碰撞诱导电位：0.4V。Cap 及 d₅-Cap 监测离子分别为：m/z225 > 208、178、m/z 230 > 213。

蜂蜜样品的加标结果见表 2,测定的三个水平的回收率在 80-90% 之间, RSD 在 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 水平为 14.4%, 其余两个水平均小于 10%。结果表明该方法测定蜂蜜中的氯霉素可以满足分析方法的要求。蜂蜜的空白样品含量 $<0.1 \mu\text{g/Kg}$, 将取样量扩大到 10g 平行测定 6 次, 结果为 0.05 ± 0.01 , RSD20%。亲和柱蜂蜜样品 $0.1 \mu\text{g/Kg}$ 加标的质量色谱图见图 5, 其信噪比为 8-14, 达到定量检出的要求, m/z 208 和 178 丰度比分别为 100%、13%, 与标准的丰度相比误差 $<20\%$, 满足分析要求。另外, 使用上述方法参加了 2005 年 3 月英国中心实验室组织的 FAPAS 蜂蜜样品的分析质量考核, 测定结果为 $0.56 \mu\text{g/Kg}$, 全世界共有 30 多家实验室参加考核, 英国中心实验室统计的均值为 $0.54 \mu\text{g/Kg}$, 我们的测定结果相当准确, z 评分为 0.2。(z 评分 ≤ 1 , 成绩优秀; $1 < z$ 评分 ≤ 2 , 成绩良好; $2 < z$ 评分 ≤ 3 , 测定结果可疑; z 评分 > 3 , 测定结果无效)。

实施例 3

用实施例 1 所述的方法制备氯霉素免疫亲和柱, 测定虾仁样品的加标回收率, 加标的水平分别为 0.1、0.3 和 $1.0 \mu\text{g/Kg}$ 。

提取: 称取空白虾仁样品 5g, 加入氯霉素标准, 加入 10ml 超纯水, 振荡溶解; 加入 25ml 乙酸乙酯振荡提取 30 分钟, 3500rpm 离心 5 分钟, 滴管转移上层有机相, 重复乙酸乙酯提取过程合并有机相; 加入 5ml 0.3M 磷酸钾缓冲液, 45°C 减压旋转蒸发至瓶口出现水雾; 蒸发残留物溶解在 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液中, 再用分别用 2ml 正己

烷液液萃取 2 次去除脂肪后备用。

净化：将制备好的氯霉素免疫亲和柱从 4℃ 冰箱中取出，室温中放置 2 小时后进行测定。放掉柱内溶液，分别用 10ml 磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH7.4）和 10ml 0.3M 磷酸钾缓冲液淋洗柱床；样品提取物上样；自然流速，弃取上样溶液；再分别用 1ml 水和 2ml 甲醇-水（20：80）淋洗弃去，2ml 甲醇洗脱并收集；4ml 甲醇淋洗，10ml 磷酸盐缓冲液（PBS，0.01 mol/L，pH7.4）活化，换液 PBS-0.01%，4℃ 保存。各收集管中加入 5ng 的内标（d₅-氯霉素）；最终用氮气吹干，加入 100 μl 乙酸乙酯和 100 μl BSTFA+TMCS (99:1)，同标准一起在 75℃ 反应 30 分钟进行衍生，氮气吹干，加入 100 μl 乙酸乙酯定容，进行 GC-MS 分析。其余过程见实施例 2

测定的三个水平的回收率在 80-90%之间，RSD 在 0.1 μg/Kg 水平小于 20%，其余两个水平均小于 10%。结果表明该方法测定虾仁中的氯霉素可以满足分析方法的要求。

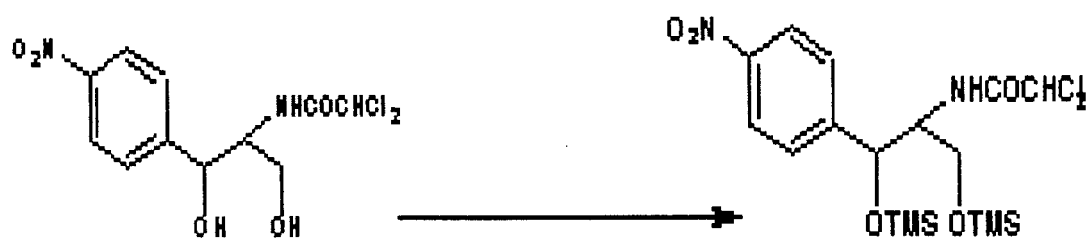


图 1

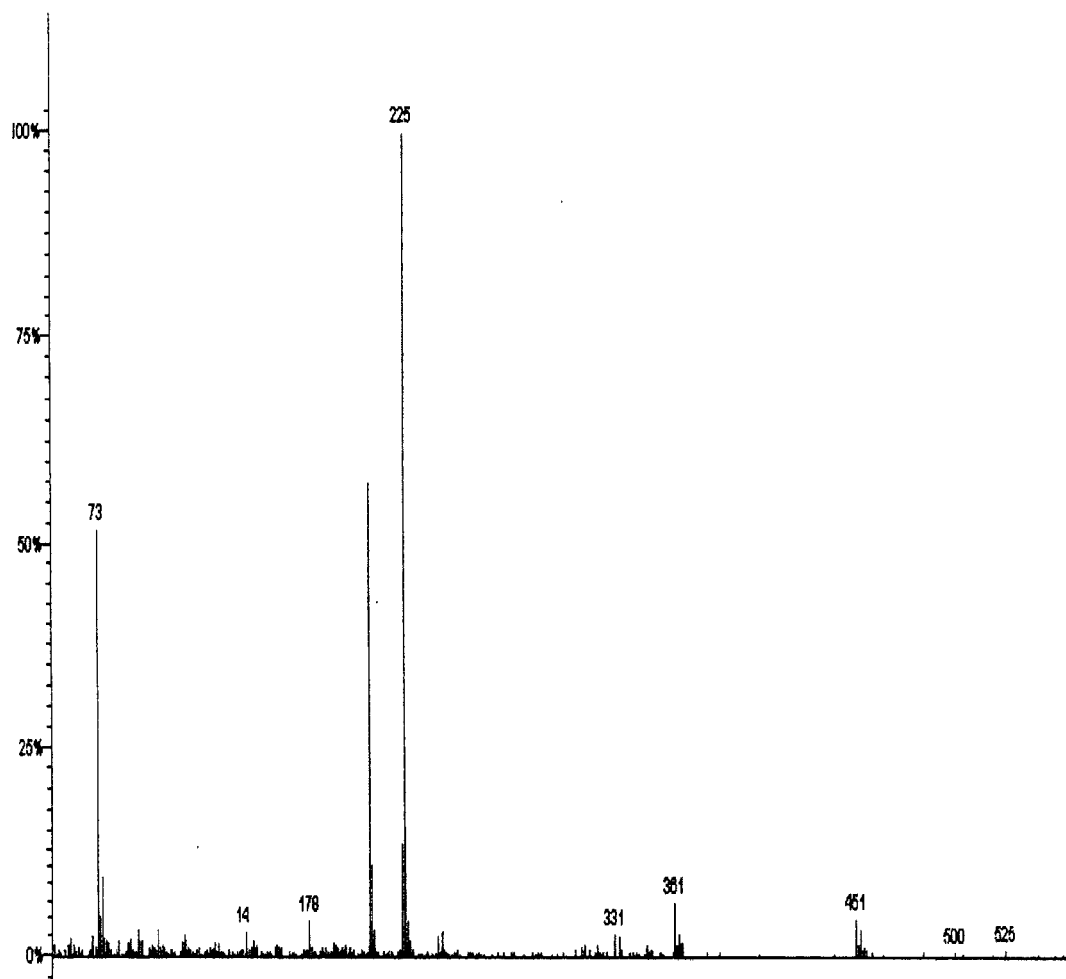


图 2

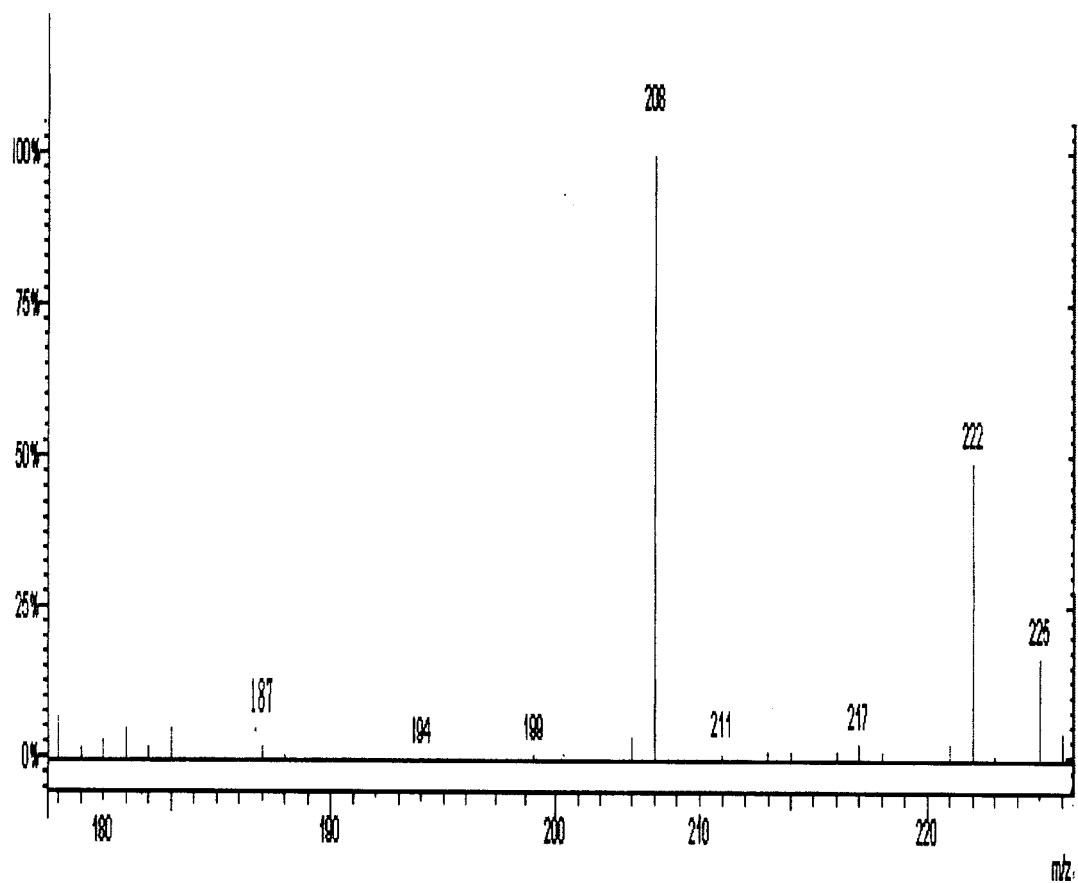


图 3

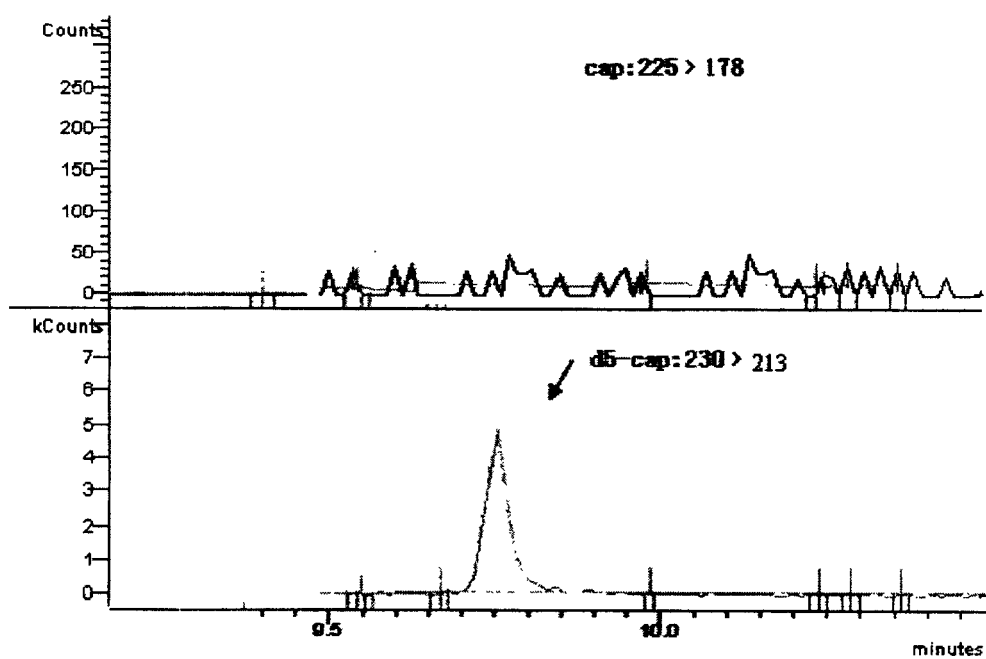


图 4

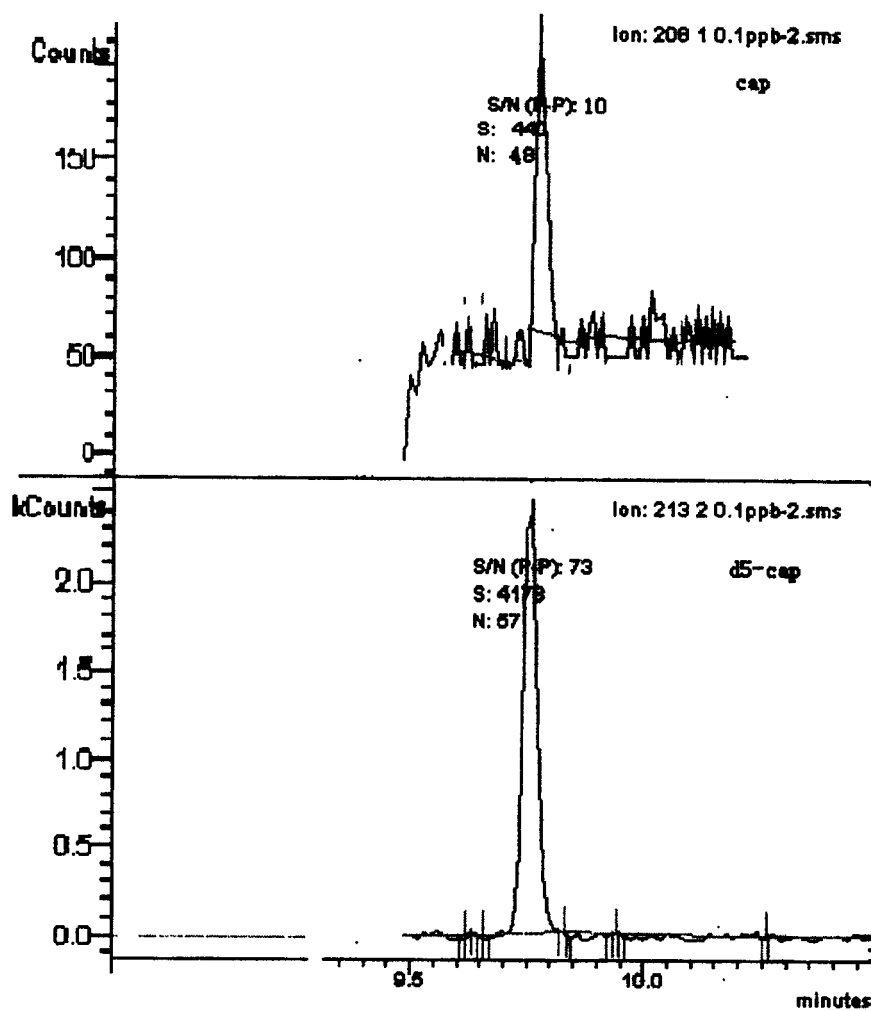


图 5

专利名称(译)	氯霉素亲和柱及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1323295C	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200510086345.4	申请日	2005-09-02
[标]申请(专利权)人(译)	王家红		
申请(专利权)人(译)	王家红		
当前申请(专利权)人(译)	王家红		
[标]发明人	张珙 王家红		
发明人	张珙 王家红		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/559		
其他公开文献	CN1731182A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种氯霉素亲和柱及其制备方法和用途，其采用蛋白A琼脂糖凝胶(protein A-Sepharose 4 fast flow)作为固相载体，载体上的蛋白A与氯霉素抗体相偶联，偶联后的氯霉素抗体又与固定相化学键合，该亲和柱制备方法简单，可重复使用的，提高了富集和净化的效率，从而提高了方法的灵敏度，理论上可以适用多种基质，由于使用了蛋白A，所以只有IgG可以联结，偶联的特异性高，柱子的氯霉素负载量大，即使使用纯溶剂也可以多次重复使用。

