



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104777296 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201510200621. 9

(22) 申请日 2015. 04. 24

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO. 9205 2014. 05. 05

(71) 申请人 重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心

地址 400020 重庆市江北区红黄路 8 号

申请人 中国检验检疫科学研究院

中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心

北京中检维康生物技术有限公司

(72) 发明人 郝存显 王国民 曹淑瑞 李蓉

张雷 王勇 果旗 姚佳 王江

王雄 余洋 李贤良

(74) 专利代理机构 重庆市恒信知识产权代理有限公司 50102

代理人 刘小红

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 30/88(2006. 01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱及其制备方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱及其制备方法与应用。本方法应用双氟沙星抗原,免疫小鼠,筛选出分泌双氟沙星抗体的杂交瘤细胞 9205,制备出单克隆抗体。采用 4% 的柱状琼脂糖凝胶作为固相载体,琼脂糖凝胶与抗双氟沙星单克隆抗体和市场上购买的抗磺胺类药物抗体偶联形成免疫吸附剂,装柱制成免疫亲和柱 (IAC)。当含有双氟沙星和磺胺类药物的样品通过 IAC 时,免疫吸附剂就会特异性的吸附双氟沙星和磺胺类药物,其他的杂质则流出 IAC 柱,然后用甲醇将双氟沙星和磺胺类从柱子中洗脱下来,样品得到了很好的净化。建立免疫亲和柱净化-液相色谱法检测双氟沙星和磺胺类药物。

1. 净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱, 其特征在于, 由如下方法制备:

a 基质制备

每 1g 琼脂糖凝胶基质粉末溶于 1mmol/L HCl 中, 然后使用 1mmol/L HCl 洗涤 15min;

b 抗体偶联

使用偶联缓冲液 0.2mol/L NaHCO_3 pH8.3 溶解待偶联的抗双氟沙星单克隆抗体和磺胺类药物单克隆抗体, 得到抗体溶液, 迅速将步骤 a 活化后的琼脂糖凝胶基质转移到抗体溶液中; 室温条件下, 充分混匀上述的混和物 2-4h;

c 配体封闭

将步骤 b 处理后的基质转移至 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 室温条件下静置 2-4h;

d 除去偶联后未偶联上的多余的配体

依次用 0.1mol/L 醋酸 / 醋酸钠缓冲液和 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液对经步骤 c 处理后的基质进行洗涤, 至少洗涤 3 个循环;

e 装柱

用 5 倍所述琼脂糖凝胶体积的 0.01% NaN_3 -PBS 洗涤, 并使用 0.01% NaN_3 -PBS 保存, 然后装柱。

2. 根据权利要求 1 所述净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱, 其特征在于: 制备所述抗双氟沙星单克隆抗体的抗双氟沙星单克隆抗体细胞保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCC NO. 9205。

3. 一种净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

a 基质制备

每 1g 琼脂糖凝胶基质粉末溶于 1mmol/L HCl 中, 然后使用 1mmol/L HCl 洗涤 15min;

b 抗体偶联

使用偶联缓冲液 0.2mol/L NaHCO_3 pH8.3 溶解待偶联的抗双氟沙星单克隆抗体和磺胺类药物单克隆抗体, 得到抗体溶液, 迅速将步骤 a 活化后的琼脂糖凝胶基质转移到抗体溶液中; 室温条件下, 充分混匀上述的混和物 2-4h;

c 配体封闭

将步骤 b 处理后的基质转移至 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液中, 室温条件下静置 2-4h;

d 除去偶联后未偶联上的多余的配体

依次用 0.1mol/L 醋酸 / 醋酸钠缓冲液和 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液对经步骤 c 处理后的基质进行洗涤, 至少洗涤 3 个循环;

e 装柱

用 5 倍所述琼脂糖凝胶体积的 0.01% NaN_3 -PBS 洗涤, 并使用 0.01% NaN_3 -PBS 保存, 然后装柱。

4. 根据权利要求 3 所述净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱的制备方法, 其特征在于: 制备所述抗双氟沙星单克隆抗体的抗双氟沙星单克隆抗体细胞保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号为 CGMCCNO. 9205。

5. 利用权利要求 1 所述复合免疫亲和柱进行双氟沙星和磺胺类药物检测的检测方法, 包括如下步骤:

用所述复合免疫亲和柱净化待测样液,然后用色谱级甲醇洗脱亲和柱,流速为 1 滴 / 秒,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供 HPLC 或 LC-MS 分析;

高效液相色谱条件如下:

双氟沙星

流动相:乙腈:四丁基溴化铵(0.030mol/LpH = 3.1) = 5:95

检测器:紫外检测器,波长 270nm

色谱柱:Cloversil-C₁₈, 4.6×150mm

流速:1.5mL/min

磺胺类药物

流动相:甲醇和 1.1%乙酸 -0.01mol PBS 溶液梯度洗脱

检测器:紫外检测器,波长 270nm

色谱柱:Cloversil-C₁₈, 4.6×250mm

流速:1.0mL/min;

定量

用进样器吸取 50 μL 标准工作液注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值,分别得到标准溶液高效液相色谱图。

净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱及其制备方法 与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种净化双氟沙星和磺胺类复合免疫亲和柱的制备与应用,更确切的说双氟沙星和磺胺类免疫亲和柱的制备方法,免疫亲和柱净化-液相色谱法检测双氟沙星和磺胺类检测方法的建立。

背景技术

[0002] 随着生命科学的发展,人们对生物体内的物质及其变化产生了越来越浓厚的兴趣,而生物样本的分析就成为探索 and 发现生命奥秘的必要手段。由于生物样本成分复杂,待测物浓度较低,而且大多数取样量很少,这就对分析方法的选择性和灵敏度提出了更高的要求。免疫亲和色谱 (Immunoaffinity Chromatography, IAC) 是一种将免疫反应与色谱分析方法相结合的分析方法。它的高度选择性和高亲和性无疑使分析过程简化。在兽药残留分析中, IAC 最简单而且最有效的应用方式是作为理化测定技术 (如 HPLC, GC) 的样品净化手段,这种联用方法可使免疫学技术和理化技术在选择性、分离能力、速度和灵敏度方面得到互补,并避免了免疫分析法 (如 ELISA, RIA) 直接测定样品的诸多不足。目前,该方法在抗体、激素、多肽、酶、重组蛋白、受体病毒及小分子化合物的分析中被广泛应用。

[0003] 双氟沙星 (difloxacin, DIF) 是美国 Abbot 公司 1984 年合成的第三代氟喹诺酮类抗菌药物。双氟沙星具有广谱抗菌作用,对多种革兰氏阴性、革兰氏阳性菌、球菌及支原体等均有较强的活性,加之其在体内分布广泛、与其他抗菌药物无交叉耐药性,已被广泛应用于细菌性疾病的防治。然而由于抗菌药物的滥用会引起药物残留在食品动物体中,从而导致食用此类动物后,引起人类病原菌对抗菌药物产生耐药性,而其产生的毒副作用还会对人体产生直接的危害,如过敏、溢血、肾衰等不良反应。

[0004] 磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 是具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称,一般为白色或微黄色结晶性粉末,无臭,味微苦。磺胺类药物是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物,种类可达数千种,其中应用较广并具有一定疗效的就有几十种。SAs 作为一类广谱抗菌药,临床上主要用于预防和治疗感染性疾病,由于其性质稳定,制造不需粮食做原料、产量大、品种多、价格低、使用简便、供应充足等优点,兽医临床和畜牧养殖业中作为饲料添加剂或动物疾病治疗药物广泛应用。但是磺胺类药物会影响人的泌尿系统功能,引起过敏性反应,甚至可能致癌。近年来,磺胺类药物的不合理使用,使其在动物性食品中的残留所引起的对生态环境污染和人类健康危害构成的潜在威胁已备受关注,成为人类亟待解决的问题之一。

[0005] 目前检测双氟沙星的方法主要有毛细管电泳法、酶联免疫法、分光光度法、液相色谱法、薄层色谱法等;检测磺胺类药物的方法主要有分光光度法、气相色谱法、液相色谱法、薄层色谱法等。这些方法的前处理常利用液-液分配,常规的 SPE 柱精华和分离,都在不同程度地存在着处理过程繁琐、净化效果差、有机溶剂浪费多、所需时间长等缺点。

[0006] 免疫亲和技术是上世纪 90 年代在分析领域得到应用的新技术,免疫亲和层析方

法的关键在于选择一种高效特异的抗体,但是,利用现有技术中的液液提取、固相萃取、加热蒸发浓缩等方法的添加回收率均较低,对后续的检测步骤造成很强的基质效应,并且现有技术中没有能够同时纯化待处理基质中 16 种磺胺类药物的免疫吸附介质,也没有能够同时纯化待处理基质中双氟沙星和 16 种磺胺类药物的免疫吸附介质,更无商品化的 IAC 柱出售,能够同时纯化分析多种抗菌药物显然能够提高检测的效率。

发明内容

[0007] 鉴于以上现有技术中的不足,本发明提供了一种可同时净化双氟沙星和磺胺类药物的免疫亲和色谱柱以及其制备方法,利用该方法制备出性能稳定、特异性强的免疫吸附剂,并建立一种经济、快捷、精确、安全,并且能同时纯化双氟沙星和 16 种磺胺类药物的方法。

[0008] 本发明采用的技术方案是:净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱,由如下方法制备:

[0009] a 基质制备

[0010] 每 1g 琼脂糖凝胶基质粉末溶于 1mmol/L HCl 中,然后使用 1mmol/L HCl 洗涤 15min;

[0011] b 抗体偶联

[0012] 使用偶联缓冲液 0.2mol/L NaHCO_3 pH8.3 溶解待偶联的抗双氟沙星单克隆抗体和磺胺类药物单克隆抗体,得到抗体溶液,迅速将步骤 a 活化后的琼脂糖凝胶基质转移到抗体溶液中;室温条件下,充分混匀上述的混和物 2-4h;

[0013] c 配体封闭

[0014] 将步骤 b 处理后的基质转移至 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液中,室温条件下静置 2-4h;

[0015] d 除去偶联后未偶联上的多余的配体

[0016] 依次用 0.1mol/L 醋酸/醋酸钠缓冲液和 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液对经步骤 c 处理后的基质进行洗涤,至少洗涤 3 个循环;

[0017] e 装柱

[0018] 用 5 倍所述琼脂糖凝胶体积的 0.01% NaN_3 -PBS 洗涤,并使用 0.01% NaN_3 -PBS 保存,然后装柱。

[0019] 制备所述抗双氟沙星单克隆抗体的抗双氟沙星单克隆抗体细胞保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC NO. 9205。

[0020] 利用上述复合免疫亲和柱进行双氟沙星和磺胺类药物检测的检测方法,包括如下步骤:

[0021] 用所述复合免疫亲和柱净化待测样液,然后用色谱级甲醇洗脱亲和柱,流速为 1 滴/秒,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供 HPLC 或 LC-MS 分析;

[0022] 高效液相色谱条件如下:

[0023] 双氟沙星

[0024] 流动相:乙腈:四丁基溴化铵 (0.030mol/L pH = 3.1) = 5:95

[0025] 检测器:紫外检测器,波长 270nm

- [0026] 色谱柱 :Cloversil-C₁₈, 4.6×150mm
- [0027] 流速 :1.5mL/min
- [0028] 磺胺类药物
- [0029] 流动相 :甲醇和 1.1% 乙酸 -0.01mol PBS 溶液梯度洗脱
- [0030] 检测器 :紫外检测器, 波长 270nm
- [0031] 色谱柱 :Cloversil-C₁₈, 4.6×250mm
- [0032] 流速 :1.0mL/min ;
- [0033] 定量
- [0034] 用进样器吸取 50 μL 标准工作液注入高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值, 分别得到标准溶液高效液相色谱图。
- [0035] 本发明制备的复合免疫亲和柱性能稳定、特异性强, 能同时纯化双氟沙星和 16 种磺胺类药物。可以有效地利用到双氟沙星和磺胺类药物的液相色谱检测中, 使检测快捷, 精确, 安全。

附图说明

- [0036] 图 1 为双氟沙星标准品的液相色谱图 ;
- [0037] 图 2 为 16 种磺胺类药物标准品的液相色谱图。

具体实施方式

[0038] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明, 而不用来限制本发明的范围。

[0039] 本发明的免疫亲和色谱柱是以免疫亲和吸附剂为填料装柱而成的 ; 所述免疫亲和吸附剂是由固相载体和与其偶联的抗双氟沙星和磺胺类药物单克隆抗体组成 ; 抗双氟沙星单克隆抗体是以双氟沙星半抗原与载体蛋白的偶联物为免疫原得到的, 抗磺胺类药物单克隆抗体为市售产品。

[0040] 实施例 1

[0041] 本实施例用于制备抗双氟沙星单克隆抗体

[0042] (1) 动物免疫 : 免疫动物为 6-8 周龄左右, 雌性 BALB/c 小鼠。免疫原 : DIF-BSA 免疫 5 只小鼠。取适量免疫原 (100 μg/ 只) 加等量弗氏完全佐剂, 制成乳化剂进行免疫, 之后佐剂改为不完全佐剂, 共免疫 6 次, 每次间隔 2 周。除第一次为颈背部皮下多点注射外, 其余均为腹腔注射。

[0043] (2) 细胞融合 : 上述被免疫小鼠的脾细胞和杂交瘤细胞按照 10:1 的比例进行细胞融合试验。

[0044] (3) 杂交瘤细胞克隆化 : 采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞, 直到筛选出分泌抗双氟沙星单克隆抗体的杂交瘤细胞 9205, 制备出单克隆抗体。抗双氟沙星单克隆抗体细胞已于 2014 年 5 月 5 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 保藏号为 CGMCC NO. 9205。

[0045] 实施例 2

[0046] 本实施例用于制备双氟沙星和磺胺类药物免疫亲和色谱柱

[0047] 1. 基质制备

[0048] 称取所需 1g 的琼脂糖凝胶 (Sepharese) 基质粉末 (每克冻干基质粉末可形成 3.5ml 终体积的溶胀基质), 溶于 1mmol/L HCl 中。基质将会立即溶胀, 然后置于烧结玻璃过滤器中使用 1mmol/L HCl 洗涤 15min。

[0049] 2. 配体 (抗体) 偶联

[0050] a 使用偶联缓冲液 0.2mol/L NaHCO_3 pH8.3 溶解待偶联的杂交瘤细胞 9205 分泌的抗双氟沙星单克隆抗体和抗磺胺类药物单克隆抗体, 抗体浓度为 8.5mg/mL, 溶解的抗体置于冰浴中暂存。在一个带盖的可完全密封的容器中加入上述含有抗体的偶联缓冲液。迅速将 CNBr 活化的 Sepharose (即经步骤 1 处理的) 转移到抗体溶液中。室温条件 (20-25℃) 下采用 end-over-end 的方式充分混匀上述的混和物 2-4h。

[0051] b 偶联率的计算: 离心, 2,000RMP $\times$ 1min, 将 sepharose 离心至管底, 将上清液转移至新的离心管中, 测定上清液的蛋白质含量值。计算偶联率为 98.8% (说明偶联很成功)。取离心至管底的 sepharose, 使用偶联缓冲液进行洗涤, 除去多余的配体。

[0052] c 封闭: 封闭所有残留的活性基团。转移基质至 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液中。室温条件下静置 2-4h。

[0053] d 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。每个洗涤循环步骤: 先用 0.1mol/L 醋酸 / 醋酸钠缓冲液洗涤, 接着再用 0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液进行洗涤。

[0054] e 用 5 倍琼脂糖凝胶体积的 0.01% NaN_3 -PBS 洗涤, 并使用 0.01% NaN_3 -PBS 保存。

[0055] 3. 装柱

[0056] 使用结合缓冲液制备浆液, 以 75% 沉降基质和 25% 缓冲液的比例进行混合。以连续性的操作向柱内倾入浆液。使用一个斜靠在柱内壁上的玻璃棒进行填柱操作, 将有助于减少气泡的产生。填柱后, 关闭亲和柱下端的开口, 并取下亲和柱的顶端部件。仔细操作, 使用缓冲液加入充填亲和柱的余下部分, 以在亲和柱的顶端形成一个向上的弯液面。将顶端筛板以一定的角度插入到亲和柱中, 确保在筛板的下方没有空气。将筛板锁定在基质表面适当的位置上, 打开亲和柱下方的开口, 用 5 倍柱床体积的无菌过滤的 0.01% NaN_3 -PBS 过柱, 并使用 0.01% NaN_3 -PBS 保存, 至此双氟沙星和磺胺类药物亲和柱已装填并平衡完毕, 可直接供使用。

[0057] 实施例 3

[0058] 本实施例用于水产品中双氟沙星和磺胺类药物的检测。

[0059] 1、样品前处理

[0060] 准确称取匀浆后的样品 5.0g 于 50mL 离心管中, 准确加入 20.0mL 80% 乙醇水溶液, 高速匀质 2min 后, 摇床震荡提取 30min, 然后 3000RPM 离心 5min。准确移取吸取上清液 5.0mL, 用 45.0mL 纯水稀释并定容至 50mL, 然后用玻璃微纤维滤纸过滤, 收集滤液于干净烧杯中, 备用。

[0061] 将免疫亲和柱连接于 20.0mL 玻璃注射器下。准确移取上述滤液 20.0mL, 以 1 滴 / 秒的流速全部通过免疫亲和柱, 直至空气流经亲和柱, 随后用 10.0mL 纯水以 1-2 滴 / 秒的流速淋洗亲和柱, 直至空气流经亲和柱。将玻璃小管置于亲和柱下, 用 2.0mL 甲醇以 1 滴 / 秒的流速淋洗亲和柱, 将所有样品淋洗液收集于玻璃小试管中, 50℃ 下氮气下吹干, 然后用

流动相定容至 500 μ L, 共 HPLC 或 LC-MS 分析。

[0062] 2、添加回收试验

[0063] 分别在空白水产品样品中添加质量浓度为 5、10、20 μ g/L 3 个梯度, 每个实验做 5 组平行试验。

[0064] 3、液相色谱条件

[0065] 双氟沙星

[0066] a 流动相: 乙腈: 四丁基溴化铵 (0.030mol/L pH = 3.1) = 5:95

[0067] b 检测器: 紫外检测器, 波长 270nm

[0068] c 色谱柱: Cloversil-C₁₈, 4.6 $\times$ 150mm (5 μ m)

[0069] d 流速: 1.5mL/min

[0070] 磺胺类药物

[0071] a 流动相: 甲醇和 1.1% 乙酸 -0.01mol PBS 溶液梯度洗脱

[0072] b 检测器: 紫外检测器, 波长 270nm

[0073] c 色谱柱: Cloversil-C₁₈, 4.6 $\times$ 250mm (5 μ m)

[0074] d 流速: 1.0mL/min

[0075] 表 1 梯度洗脱表

[0076]

时间 (min)	甲醇 (%)	1.1%乙酸 / 0.01 M PBS 溶液 (%)
0	15	85
15	15	85
40	40	60
40.1	15	85

[0077] 用进样器吸取标准工作液 50 μ L 注入高效液相色谱仪, 在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值 (峰高或峰面积), 分别得到标准溶液高效液相色谱图。

[0078] 结果

[0079] 水产品样品添加回收率均在 80 ~ 103% 之间, 相对标准偏差均小于 9.0%, 表明该方法满足水产品中双氟沙星和磺胺类药物检测的分析要求。结果见表 1。

[0080] 表 1 水产品样品中添加双氟沙星和磺胺类标准品的回收率和精密度 (n = 5)

[0081]

添加浓度/ μ g/L		回收率/%					RSD/%
双氟沙星	5	84.68	98.24	83.43	94.54	81.72	8.33
	10	83.61	94.04	87.39	97.76	98.41	7.06
	20	92.93	84.22	93.51	84.82	87.77	4.95
磺胺醋酰 (SA)	5	86.60	93.96	92.16	89.14	96.83	4.37
	10	95.74	98.62	88.59	91.52	87.12	5.22

[0082]

	20	98.56	90.81	96.90	89.32	91.18	4.39
	5	84.11	85.53	82.19	86.37	88.46	2.76
磺胺嘧啶 (SDZ)	10	85.82	94.37	87.92	84.44	91.65	4.63
	20	93.17	82.42	93.10	87.48	83.66	5.77
	5	88.64	86.08	87.52	84.71	89.53	2.22
磺胺吡啶 (SPD)	10	88.43	91.51	97.28	97.55	93.03	4.16
	20	101.11	103.57	97.26	97.12	94.14	3.75
	5	88.78	86.45	87.66	92.05	83.23	3.68
磺胺对甲氧基嘧啶 (SMD)	10	86.78	85.25	94.51	90.57	87.68	4.11
	20	93.17	89.54	95.32	99.67	84.04	6.41
	5	85.82	87.26	88.24	90.82	85.28	2.52
磺胺二甲嘧啶 (SM2)	10	87.48	91.22	87.26	83.53	88.70	3.18
	20	90.29	84.17	85.95	89.80	100.21	6.90
	5	86.21	84.03	91.62	85.33	92.65	4.43
磺胺甲恶唑 (SMZ)	10	84.51	88.41	95.34	90.17	87.54	4.49
	20	89.87	91.66	95.84	87.26	88.10	3.77
	5	91.85	88.30	83.18	90.06	93.33	4.40
磺胺异恶唑 (SIZ)	10	87.26	84.39	91.81	87.80	82.52	4.09
	20	89.09	99.62	86.61	84.23	87.65	6.66
	5	87.69	83.17	93.82	90.65	89.78	4.43
磺胺间二甲氧嘧啶 (SDM)	10	85.47	94.28	84.32	96.24	92.18	5.89
	20	95.37	89.01	86.45	97.15	96.52	5.22
	5	95.38	82.45	88.76	94.02	92.19	5.71
磺胺二甲异嘧啶 (SIM2)	10	94.36	87.47	83.58	101.69	86.71	8.01
	20	89.32	85.43	91.76	97.65	83.98	6.07
	5	85.59	93.59	99.63	97.02	88.19	6.34
磺胺噻唑 (ST)	10	87.23	94.40	97.29	95.22	92.22	4.11
	20	83.29	95.37	97.12	86.33	102.43	8.51
	5	87.70	86.94	98.46	91.52	95.68	5.42
磺胺甲基嘧啶 (SMR)	10	92.59	84.48	90.83	89.49	93.76	4.00
	20	90.54	88.34	83.95	95.15	91.44	4.59
	5	86.77	93.40	95.16	83.33	89.70	5.37
磺胺甲噻二唑 (SMTZ)	10	92.84	93.54	98.62	87.97	85.39	5.62
	20	87.12	96.92	94.66	95.07	87.60	4.95
	5	96.99	96.51	88.20	89.43	87.32	5.11
磺胺氯哒嗪钠 (SCP)	10	82.38	82.75	86.66	83.49	98.80	7.96
	20	84.31	83.78	91.82	88.25	86.76	3.75
磺胺间甲氧嘧啶	5	82.33	88.92	93.10	97.23	83.30	7.14
	10	98.13	95.62	95.25	89.73	82.89	6.61

[0083]

(SMM)	20	86.03	97.27	94.09	95.30	92.29	4.62
磺胺氯吡嗪钠	5	83.42	91.04	97.53	96.94	93.58	6.18
	10	87.67	91.29	96.37	86.81	93.66	4.41
	20	85.90	89.89	95.12	99.39	94.11	5.56
磺胺喹恶啉	5	87.36	87.68	95.03	91.53	84.41	4.62
	10	89.65	95.89	94.52	86.86	87.74	4.46
	20	89.91	93.99	92.54	99.54	95.25	3.78

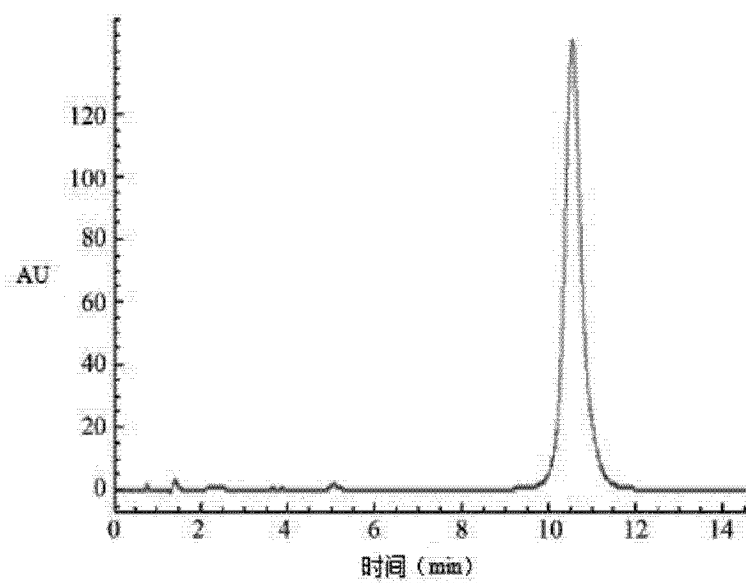


图 1

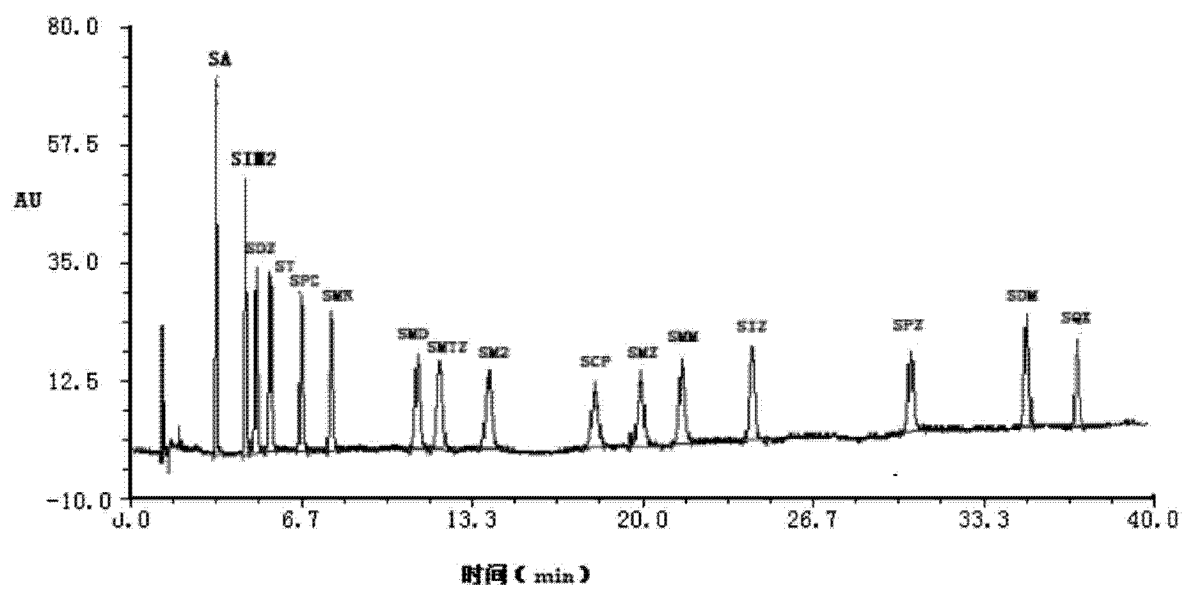


图 2

专利名称(译)	净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104777296A	公开(公告)日	2015-07-15
申请号	CN201510200621.9	申请日	2015-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心 北京中检维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中国检验检疫科学研究院 中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心 北京中检维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	重庆出入境检验检疫局检验检疫技术中心 中国检验检疫科学研究院 中山出入境检验检疫局检验检疫技术中心 北京中检维康生物技术有限公司		
[标]发明人	郗存显 王国民 曹淑瑞 李蓉 张雷 王勇 果旗 姚佳 王江 王雄 余洋 李贤良		
发明人	郗存显 王国民 曹淑瑞 李蓉 张雷 王勇 果旗 姚佳 王江 王雄 余洋 李贤良		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/577 G01N30/88		
CPC分类号	B01J20/281 B01D15/3804 B01D15/3809 B01J20/28047 B01J2220/54 B01J2220/58 G01N30/06 G01N30/88 G01N33/531 G01N33/577 G01N2030/065		
代理人(译)	刘小红		
外部链接	Espacenet SIPO		
摘要(译)			

本发明涉及一种净化双氟沙星和磺胺类药物复合免疫亲和柱及其制备方法与应用。本方法应用双氟沙星抗原，免疫小鼠，筛选出分泌双氟沙星抗体的杂交瘤细胞9205，制备出单克隆抗体。采用4%的柱状琼脂糖凝胶作为固相载体，琼脂糖凝胶与抗双氟沙星单克隆抗体和市场上购买的抗磺胺类药物抗体偶联形成免疫吸附剂，装柱制成免疫亲和柱(IAC)。当含有双氟沙星和磺胺类药物的样品通过IAC时，免疫吸附剂就会特异性的吸附双氟沙星和磺胺类药物，其他的杂质则流出IAC柱，然后用甲醇将双氟沙星和磺胺类从柱子中洗脱下来，样品得到了很好的净化。建立免疫亲和柱净化-液相色谱法检测双氟沙星和磺胺类药物。

时间 (min)	甲醇 (%)	1.1%乙酸 / 0.01 M PBS溶液 (%)
0	15	85
15	15	85
40	40	60
40.1	15	85