

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610155569.0

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1996017A

[22] 申请日 2006.12.29

[21] 申请号 200610155569.0

[71] 申请人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州市下城区凯旋路 258
号浙大华家池校区浙江大学科学楼

[72] 发明人 陈正贤 邬建敏 叶兴乾 沈立荣
吴建祥 马志超 徐 正

[74] 专利代理机构 杭州之江专利事务所
代理人 连寿金

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物的制备方法

[57] 摘要

一种氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物的制备方法, 是将氯霉素溶于无水吡啶中, 并加入琥珀酸酐, 使氯霉素分子导入了羧基, 加交联剂 EDAC 和 6 - 氨基己酸, 使氯霉素衍生物中的羧基与 6 - 氨基己酸中的氨基缩合, 增长了碳链, 然后与颗粒细胞进行偶联, 得到氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物, 该复合物是一种氯霉素人工抗原。同现有技术比较, 本发明的优点是将本氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物作为一种氯霉素人工抗原用于动物体氯霉素残留量检测及免疫检测上, 具有检测快速、操作简便、成本低的优点。

1. 一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，其特征在于采用以下步骤：

A) 按重量比为 1 : 0.3~0.5 分别称取氯霉素和琥珀酸酐，先后加入到无水吡啶中，无水吡啶用量按 1 克氯霉素加 5-20 毫升比例添加，在封闭容器中水浴 60 度 6-24h，生成含有羧基的氯霉素衍生物；

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中，加入氯霉素原反应体积的 5-10 倍的冰冷 1-5N 盐酸量，离心管以每分钟 1000 转的转速转动 10 分钟，析出含有羧基的氯霉素红色产物，再用 2-10 倍体积的 1-5N 盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀 2-3 次，得到紫红色沉淀物；

C) 向沉淀物中加入浓度为 40~75%的乙醇溶液，沉淀物溶解后加入氯霉素重量 20~50 %的水溶性碳化二亚胺 EDAC，在常温下反应 5-10 分钟后，加入氯霉素重量 30~50%的 6-氨基己酸，生成带有碳链手臂的氯霉素；

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量 20~50%的水溶性碳化二亚胺，反应 5-10 分钟后，再加入氯霉素重量 50-200 倍重量的待偶联的颗粒细胞进行偶联反应，通过 10000 转离心 10 分钟，离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物，获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物，该复合物为一种氯霉素人工抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：颗粒细胞是指常规原核细胞或真核细胞。

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法

技术领域

本发明涉及一种含有氯霉素的复合物，特别涉及一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法。

背景技术

氯霉素是人体及动物治病防病的一种重要的抗生素，在动物治病中应用广泛，由于价格低廉等因素该抗菌素被广泛应用到动物的饲料中，是常用的动物饲料添加剂之一。但是抗生素的不合理的滥用导致许多病菌能够耐受抗生素，产生抗药性，对抗生素的有效治疗疾病带来负面影响。随着人们生活水平以及对滥用抗生素的防范意识的提高，逐渐认识到滥用抗生素的危害性，开始关注氯霉素的毒副作用，尤其肉食品中的抗生素的残留量，肉食品及水产品的进出口贸易中对添加剂的成分及其含量，均有严格的限定。

肉制品及水产品中的氯霉素的残留量是否超标通常采用色谱检测法，但操作较烦，且需要专人测定，给生产企业了解抗生素的残留量带来困难；后来人们开展放射免疫测定及酶联免疫测定，但设备要从国外进口，价格昂贵；由于氯霉素是半抗原，需要与载体蛋白交联才能制备相应的抗氯霉素的抗体，在此基础上才能建立相关的免疫检测方法。

发明内容

本发明的目的在于提供一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，将该人工抗原用于动物体氯霉素残留量及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点。

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，其特征在于采用以下步骤：

A) 按重量比为 1 : 0.3~0.5 分别称取氯霉素和琥珀酸酐，先后加入到无水吡啶中，无水吡啶用量按 1 克氯霉素加 5-20 毫升比例添加，在封闭容器中水浴 6-24h，生成含有羧基的氯霉素衍生物；

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中，加入氯霉素原反应体积的5-10倍的冰冷1-5N盐酸量，离心管以每分钟1000转的转速转动10分钟，析出含有羧基的氯霉素红色产物，再用2-10倍体积的1-5N盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀2次，得到紫红色沉淀物；

C) 向沉淀物中加入浓度为40~75%的乙醇溶液，沉淀物溶解后加入氯霉素重量20~50%的水溶性碳化二亚胺EDAC，在常温下反应5-10分钟后，加入氯霉素重量30~50%的6-氨基己酸，生成带有碳链手臂的氯霉素；

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量20~50%的水溶性碳化二亚胺，反应5-10分钟后，再加入氯霉素重量50-200倍重量的待偶联的颗粒细胞进行偶联反应，离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物，获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物，该复合物为一种氯霉素人工抗原；颗粒细胞是指常规原核细胞或真核细胞。

同现有技术比较，本发明的优点是：将本氯霉素-颗粒细胞偶联复合物作为氯霉素人工抗原，用于动物体氯霉素残留量检测及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点。

具体实施方式

实施例1：

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，其特征在于采用以下步骤：

A) 按重量比为1:0.3分别称取氯霉素和琥珀酸酐，先后加入到无水吡啶中，无水吡啶用量按1克氯霉素加5毫升比例添加，小量制备可在封闭容器中水浴60℃、24h(大量制备则需要是在回流装置中进行水浴60℃、24h)，生成含有羧基的氯霉素衍生物；

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中，加入氯霉素原反应体积的5倍的冰冷5N盐酸量，离心管以每分钟1000转的转速转动10分钟，析出含有羧基的氯霉素红色产物，再用2倍体积的5N盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀2次，得到紫红色沉淀物；

C) 向沉淀物中加入浓度为40%的乙醇溶液，沉淀物溶解后加入氯霉素重量50%的水溶性碳化二亚胺EDAC，在常温下反应5分钟后，加入氯霉素

重量 50%的 6-氨基己酸，生成带有碳链手臂的氯霉素；

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量 20%的水溶性碳化二亚胺，反应 10 分钟后，再加入氯霉素重量 50 倍重量的待偶联的常规细菌进行偶联反应，通过 10000 转离心 10 分钟，离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物，获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物，该复合物为一种氯霉素人工抗原。

实施例 2:

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，其特征在于采用以下步骤：

A) 按重量比为 1 : 0.5 分别称取氯霉素和琥珀酸酐，先后加入到无水吡啶中，无水吡啶用量按 1 克氯霉素加 20 毫升比例添加，小量制备可在封闭容器中水浴 60℃、24h(大量制备则需要有回流装置中进行水浴 60℃、24h)，生成含有羧基的氯霉素衍生物；

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中，加入氯霉素原反应体积的 10 倍的冰冷 1N 盐酸量，离心管以每分钟 1000 转的转速转动 10 分钟，析出含有羧基的氯霉素红色产物，再用 10 倍体积的 1N 盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀 3 次，得到紫红色沉淀物；

C) 向沉淀物中加入浓度为 75%的乙醇溶液，沉淀物溶解后加入氯霉素重量 20%的水溶性碳化二亚胺 EDAC，在常温下反应 10 分钟后，加入氯霉素重量 30%的 6-氨基己酸，生成带有碳链手臂的氯霉素；

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量 50%的水溶性碳化二亚胺，反应 5 分钟后，再加入氯霉素重量 200 倍重量的待偶联的常规细菌进行偶联反应，通过 10000 转离心 10 分钟，离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物，获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物，该复合物为一种氯霉素人工抗原。

实施例 3:

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法，其特征在于采用以下步骤：

A) 按重量比为 1 : 0.4 分别称取氯霉素和琥珀酸酐, 先后加入到无水吡啶中, 无水吡啶用量按 1 克氯霉素加 12 毫升比例添加, 小量制备可在封闭容器中水浴 60°C、24h(大量制备则需要有回流装置中进行水浴 60°C、24h), 生成含有羧基的氯霉素衍生物;

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中, 加入氯霉素原反应体积的 7 倍的冰冷 3N 盐酸量, 离心管以每分钟 1000 转的转速转动 10 分钟, 析出含有羧基的氯霉素红色产物, 再用 7 倍体积的 3N 盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀 3 次, 得到紫红色沉淀物;

C) 向沉淀物中加入浓度为 55% 的乙醇溶液, 沉淀物溶解后加入氯霉素重量 35 % 的水溶性碳化二亚胺 EDAC, 在常温下反应 8 分钟后, 加入氯霉素重量 40% 的 6-氨基己酸, 生成带有碳链手臂的氯霉素;

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量 35% 的水溶性碳化二亚胺, 反应 8 分钟后, 再加入氯霉素重量 120 倍重量的待偶联的常规细菌进行偶联反应, 通过 10000 转离心 10 分钟, 离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物, 获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物, 该复合物为一种氯霉素人工抗原。

实施例 4:

一种氯霉素-颗粒细胞偶联复合物的制备方法, 其特征在于采用以下步骤:

A) 按重量比为 1 : 0.5 分别称取氯霉素和琥珀酸酐, 先后加入到无水吡啶中, 无水吡啶用量按 1 克氯霉素加 20 毫升比例添加, 小量制备可在封闭容器中水浴 60°C、24h(大量制备则需要有回流装置中进行水浴 60°C、24h), 生成含有羧基的氯霉素衍生物;

B) 将上述氯霉素衍生物置于离心管中, 加入氯霉素原反应体积的 10 倍的冰冷 1N 盐酸量, 离心管以每分钟 1000 转的转速转动 10 分钟, 析出含有羧基的氯霉素红色产物, 再用 10 倍体积的 1N 盐酸冰冷的盐酸溶液离心洗涤沉淀 3 次, 得到紫红色沉淀物;

C) 向沉淀物中加入浓度为 75% 的乙醇溶液, 沉淀物溶解后加入氯霉素重量 20% 的水溶性碳化二亚胺 EDAC, 在常温下反应 10 分钟后, 加入氯霉

素重量 30%的 6-氨基己酸，生成带有碳链手臂的氯霉素；

D) 在带有碳链手臂的氯霉素中加入氯霉素重量 50%的水溶性碳化二亚胺，反应 5 分钟后，再加入氯霉素重量 200 倍重量的待偶联的普通酵母菌进行偶联反应，通过 10000 转离心 10 分钟，离心洗涤除去未能偶联的自由小分子化合物，获得氯霉素-颗粒细胞偶联复合物，该复合物为一种氯霉素人工抗原。

专利名称(译)	一种氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物的制备方法		
公开(公告)号	CN1996017A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200610155569.0	申请日	2006-12-29
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	陈正贤 邬建敏 叶兴乾 沈立荣 吴建祥 马志超 徐正		
发明人	陈正贤 邬建敏 叶兴乾 沈立荣 吴建祥 马志超 徐正		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物的制备方法，是将氯霉素溶于无水吡啶中，并加入琥珀酸酐，使氯霉素分子导入了羧基，加交联剂EDAC和6 - 氨基己酸，使氯霉素衍生物中的羧基与6 - 氨基己酸中的氨基缩合，增长了碳链，然后与颗粒细胞进行偶联，得到氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物，该复合物是一种氯霉素人工抗原。同现有技术比较，本发明的优点是将本氯霉素 - 颗粒细胞偶联复合物作为一种氯霉素人工抗原用于动物体氯霉素残留量检测及免疫检测上，具有检测快速、操作简便、成本低的优点。