

回顧性論文

免疫親和性層析的進展與應用

周璵瑩* 陳緯傑 李芳錦

慈濟大學醫學檢驗生物技術學系暨醫學生物技術研究所

摘要：利用抗體對抗原的專一性與親和性，將欲檢測之目標物的抗體固定於固態表面，並以此修飾之固態物填充管柱，作為液相層析儀的分析管，此種層析稱之為免疫親和性層析，因免疫親和性層析對檢測目標物及其類似物具有選擇性與親和性，所以能用於檢測處於極端複雜之環境中的目標物（如生物檢體），同時能夠分辨目標物與其類似物，相較於傳統層析方法，不但可以省去繁雜的樣品前處理流程，節省檢測時間，同時也節省濃縮與萃取所需的有機溶劑，對環境保護、操作人員的健康及檢測成本有極大的效益，本文將為大家介紹免疫親和性管柱的進展與應用。

關鍵字：抗體、抗原、免疫親和性層析、免疫親和性管柱

一、免疫親和性層析之特點

利用免疫分析法（Immunoassays）具有快速、高專一性及高靈敏度的優點，缺點為無法分辨交叉反應物（cross-reactants），分析物（analyte）須進一步被確認鑑定，才能確認其為何種化合物，常見的方法是利用氣相層析質譜（GC-MASS）做再確認。若交叉反應物與分析的目標物互為光學異構物時，則質譜亦無法分辨，且一般免疫分析法只適合於作為鑑定工作，無法實際分離出目標物。傳統的液相層析法（liquid chromatography）運用於藥物光學異構物的分離，則因固定相（stationary phase）的設計及找尋適當的層析條件往往花費較長的時間，對於分析物的濃度極低的樣品，需事先經過純化與濃縮，增加分析時間及人力成本，同時亦可能因繁雜的操作過程而污染了藥物，因而降低藥物的品質，此外純

化與濃縮過程所使用的有機溶劑對操作人員的健康及對環境亦造成衝擊。若能結合免疫分析法及傳統液相層析法，將要被純化的目標物之抗體鍵結在固態物質表面上（如纖維、玻璃珠或矽膠等），以此填充管柱，此種管柱稱為免疫親和性管柱（immunoaffinity column；IAC），利用抗體對抗原的專一性與親和性，IAC 兼具有從極端複雜的環境中萃取出目標物及其類似物（交叉反應物），亦能利用抗體對目標物與其類似物的親和力不同，藉由改變移動相的特性而將它們層析分離之，此種層析方式稱之為免疫親和性層析（immunoaffinity chromatography），其具有免疫分析及液態層析的優點且能避免兩項技術的缺陷。

二、免疫親和性管柱的應用

逐步梯度沖提 (step gradient elution) 是 IAC 最典型的沖提方式，步驟是先利用沖提力較弱的移動相將樣品引入 IAC，在此沖提條件下，目標物及其類似物會被固定相吸附，其他雜質被沖出管柱，隨後改變沖提條件，將目標物及其類似物逐一沖出管柱，同時達到萃取、純化、分離及檢測目標物及其類似物的目的，利用 IAC 純化或檢測物質的方法可以簡化純化、檢測樣品的處理流程，亦可以避免有機溶劑的使用，不但節省檢測或純化物質的時間，同時能夠達到零污染的目標，對於操作人員的健康及環境不會造成任何危害。在環境保護日趨嚴格的今天，可以預見未來的分析化學界中，利用 IAC 的檢測分析或純化物質的方法將會日趨普遍。

以 IAC 作為分析管柱之層析稱為免疫親和性層析，耐高壓之 IAC 才能作為高效率液相層析 (high performance liquid chromatography) 的分析管，無法耐高壓的 IAC (如支撐物為多糖體、樹脂等) 常被作為檢測分析方法之樣品前處理的純化管柱，如下所述，目前檢測目標物之過程中利用到 IAC 的文獻幾乎全部屬於此類型。

2004 年至今在 Sciencedirect online 和 Scopus 資料庫中，利用 IAC 萃取檢測目標物之文獻有：萃取牛奶¹、動物肝臟²、中藥材³及酸奶酪⁴中的黃麴毒素 (Aflatoxins)；食品中之 Mycotoxins (aflatoxin, ochratoxin, zearalenone 及 deoxynivalenone)⁵、維他命 B₁₂⁶ 或 aflatoxins 與 ochratoxin A⁷；病人血液或尿中之 Tetrodotoxin⁸；醬油⁹、酒¹⁰⁻¹²、可可粉¹³、尿液¹⁴及義大利臘腸¹⁵中之 ochratoxin A；果皮中之罌粟成份¹⁶；尿液中之 8-nitroguanine¹⁷；飲用水中之 microcystin-LR (MC-LR；a cyclic heptapeptide toxin)¹⁸；飼料或動物飲水中之 Corticosteroids (如 dexamethasone)¹⁹；罐裝飲料、果汁、蔬菜汁中之 bisphenol A²⁰；穀物中的 T-2 和 HT-2 toxins²¹。以上文獻皆利用 IAC 萃取目標物，再利用 HPLC 以固定相是 C₁₈ (Octadecyl silica gel) 的分析管柱分析萃取液中的目標物，並以光學偵測器 (紫外線、可見光或螢光) 偵測之。另外有以 IAC 萃取尿液中的 erythropoietin (EPO)，再以 ELISA 定量萃取液中之目標物²²；或以 IAC 萃取兔子肝臟血漿蛋白質 (protein A or protein G)²³；馬尿或血漿中的 zearalenone 及其代謝物²⁴；或利用濾管吸附香煙，再以異丙醇洗下吸附物，經由 IAC 萃取 aflatoxin B₁²⁵，並利用 C₁₈ 管柱以高效率液相層析質譜儀 (HPLC-MS) 分析偵測萃取物；或以 IAC 萃取懷孕婦女尿液中之雌激素 (estradiol, estrone and estriol)，再以微粒電動層析 (micellar electrokinetic chromatography; MEKC) 分析萃取液²⁶；或利用多株抗體製備成的 IAC 萃

取嫌疑犯尿液中的嗎啡類藥物，再以毛細電泳分析萃取物²⁷。另外類似運用 IAC 萃取之原理，用於檢測水中清潔劑 (linear alkylbenzenesulfonates; LASs) 的方法亦被提及²⁸。以上文獻皆利用 IAC 萃取作為樣品前處理的方法，相較於利用有機溶劑萃取之方法，不但可以降低有毒有機溶劑之使用量、簡化樣品之製備流程與時間，同時因為對目標物具有選擇性，可以減少萃取液中雜質的含量，提高後續 HPLC 檢測或其他偵測方法之靈敏度與解析度。

有關於利用 IAC 直接分析樣品，線上檢測 (on line detection) 目標物的文獻則較少，可能是礙於 IAC 吸附目標物後，再將目標物脫附的過程中，移動相的特性變化太大 (常見的方法是改變移動相的 pH 值、離子強度或有機溶劑的比率等)，導致一般以光學偵測器偵測時的基線漂移太大，淹沒了目標物的訊號，若以質譜儀作為偵測器時，則要找尋揮發性的移動相，且又要符合能夠改變移動相的特性以達到吸附與脫附目標物的功能。2005 年，Hei ke Hofstetter, Oliver Hofstetter 等人以文獻回顧的方式，介紹利用特製的抗體所製成的 IAC 分離立體異構物的相關文獻²⁹，其中多數的文獻仍為離線偵測 (off-line detection)。

三、免疫親和性層析應用於生物體液檢體之實例

本實驗室利用抗 D-form 甲基安非他命 (methamphetamine; MA) 之老鼠單株抗體鍵結於矽膠表面，再以此修飾之矽膠製備 HPLC 管柱，實驗證實此 IAC 能夠直接從尿液中萃取並分離甲基安非他命 (methamphetamine; MA) 之光學異構物³⁰，尿液樣品只需經由 0.45μm 濾膜過濾後，即被注入高效率液相層析儀 (HPLC) 系統分析之，移動相為磷酸鹽水溶液，改變其 pH 值 (3.5-8.0 之間)，將尿液中 MA 的光學異構物直接萃取出並分離之，目前為止，此管柱已操作過 1000 次以上，層析性能沒有明顯衰退，可見 pH 值在此範圍內改變，幾乎不會損壞 IAC 內被固定化之抗體對抗原的吸附能力，但因 pH 值變化太大，導致紫外光偵測器的基線漂移，訊號微弱，無法線上直接定量分析，因此利用收集儀收集 IAC 流出液，再以免疫分析法分析收集到的每支試管中 MA 的含量。為了達到即時線上偵測定量 D-form MA，後來我們將上述之 IAC 運用於 LC-MS 上

³¹，移動相為醋酸鉍與醋酸的緩衝液，同樣是改變移動相的 pH 值(3.5-7.0)，可以達到吸附及脫附目標物的功能，並達到線上定量偵測目標物的目的。相較於目前分辨、檢測尿液中 methamphetamine (MA)的光學異構物的方法，文獻³¹所建立的方法具有如下之特性：

- 1.能夠直接從尿液中萃取、分辨出 MA 的光學異構物，並同時檢測、定量 D- (+)-methamphetamine (D-MA)，所以能夠避免免疫分析法或者質譜檢測的假陽性結果。
- 2.由於 IAC 對於 D-MA 有線上萃取濃縮的功能，所以對於含 D-MA 濃度極低之尿液樣品亦能直接檢測。
- 3.相較於目前檢測分辨尿液中 MA 光學異構物的方法（如液相層析儀或氣相層析儀），此法可以省去繁雜的濃縮萃取、衍生等步驟，不但節省人工成本，也省去溶劑、衍生藥劑的購買經費，提升檢測效率並降低檢測成本，並避免有毒有機溶劑、試劑對操作人員的健康及環境造成衝擊。

四、縮小層析管柱內徑之優點

20 年前，Scott 和 Kucera 首先研究微流分析管（micro flow column）³²⁻³⁵，一般而言，此類分析管是指內徑小於 1 mm 的分析管³⁶，即所謂的毛細分析管，相較於一般高效率液相層析（HPLC）分析管柱，毛細高效率液相層析(capillary HPLC；CHPLC)具有如下優點：

1. 由於分析管的截面積與內徑的平方成正比，所以分析物在截面的分布濃度與分析管的內徑平方成反比關係³⁷，同時由於移動相在分析管中心的流速與靠近管壁的流速之差異亦隨分析管的內徑縮小而變小，使得分析物沿著分析管的縱向擴散距離亦隨分析管的內徑縮小而變小，所以縮小分析管的內徑，可以有效地提升訊號強度及降低訊號峰的寬度，因而提升分析效能及檢測靈敏度。文獻³⁸曾以不同內徑（內徑分別為 2.1, 0.5, 0.3 mm I.D.）的 C₁₈管柱，長度皆為 15 cm，移動相流速分別為 12.0, 4.2, 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ ，樣品濃度分別為 30.0, 12.3, 4.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，樣品注入體積皆為 0.1 μl ，利用液相層析電灑游離質譜儀（Liquid chromatography electrospray ionization mass；LC/ESI/MS）做 salmeterol 定量分析，探討分析管內徑大小對分析物偵測靈敏度的影響，結果發現層析管柱的內徑愈小，分離效果愈好。1995 年，Ryan 曾以模型推導出具同樣長度的分析管，檢測的靈敏度與分析

管的內徑平方成反比關係³⁹，譬如將 2.1 mm I.D.之分析管縮小為 0.5mm I.D.時，檢測靈敏度將提升為原來的 17 倍。2. 在同樣的流速下，移動相的流量與分析管的內徑平方呈正比關係，所以使用毛細分析管可以大大減少移動相的使用，降低有機溶劑的消耗量，減少分析成本，同時降低有毒溶劑對環境的衝擊。3. 毛細分析管較傳統分析管的製備成本低，尤其是免疫親和性管柱，在抗體的來源不是自行培養的情況下，更能節省大量的抗體購買成本，大大降低分析管的製備成本。4. 由於分析效能及檢測靈敏度的提升，樣品的體積更少，可以檢測更微量的樣品。由於以上的優勢，CHPLC 在未來分析檢測的應用上，有愈來愈被重視的趨勢。

五、毛細分析管之製備方式及實例

從製備方式區分，毛細液相層析的分析管大致可分為開放式毛細管（open tubular capillary columns；otcc）及填充式毛細管（packed capillary columns；pcc），相較於 otcc，pcc 有較佳的樣品容量（sample capacity）及較多種類的填充材料，但缺點為壓降太大，填充材料必須能夠耐高壓，否則容易被壓垮，且需於毛細管末端內部製備出機械強度夠、穿透性好且化學穩定高（chemical inertness）的濾頭（frit），這是目前填充式毛細管需要克服的問題。有關於填充式毛細管的製備技術的相關報導很多⁴⁰⁻⁵⁹，如文獻⁴⁹敘述的製備方法是將 100 μl 的三氟乙酸、75 μl methyltriethoxysilane、10 μl 水、200 μl 二氯甲烷及 0.15 克矽膠（5 μm ，Zorbax BP-Sil）的懸浮液吸入事先用二氯甲烷清洗及氮氣吹乾的毛細管（250 μm I.D.; 380 μm O.D.）之前端(長度約 2-3 mm)做聚合反應。懸浮液中含 5-10%水的三氟乙酸之目的是催化矽烷偶合劑，使之與矽膠表面或毛細管內壁的 OH 基產生鍵結，形成三度空間的網狀鍵結，膠化反應在 30°C 下維持 30 分鐘後，再置入 100°C 爐子中 6 小時乾燥之，被封口的毛細管(長度為 18-40 cm)再以 400 bars 的壓力填充 ODS 矽膠顆粒，填充過程是將矽膠懸浮於丙酮中，以超音波震盪 5 min，倒入 slurry chamber (25mm*1mm ID)，並同時以超音波震盪毛細管，最後毛細管再浸入新鮮配製的上述懸浮液中作封口聚膠反應。

otcc 首先在 1959 年被用為氣相層析(gas chromatography；GC)的分析管⁶⁰，其製備方法是藉由修飾毛細管的內壁或將修飾劑（modifier）添加於移動相

中，整支管子幾乎是中空的，因此沒有壓降的問題，相較於 pcc，在適當的內徑範圍，擁有較高的分離效率，所以在 GC 的應用上很快地取代了 pcc 的地位。在 HPLC 的應用上，從理論或者實際實驗上⁶¹⁻⁶⁶亦證實 otcc 比 pcc 有較多的好處，分離效率最佳的 otcc 內徑約為 2 μm ^{67, 68}；內徑小於 5 μm 的毛細管，作成 otcc 的分析能力才會比作成 pcc 好^{61, 64}。製備逆相或正相層析的分析管時，因 otcc 與 pcc 固定相的量之比值會隨著毛細管的內徑增加而快速變小，即與 pcc 相比較，otcc 對分析物的容量因子 (capacity factor) 會隨毛細管內徑增加而劇烈下降，因而使得到達偵測器的分析物濃度下降，所以當毛細管的內徑太大時，otcc 的分離性能就不會比 pcc 好。

由於 IAC 具有萃取的功能，使得 otcc 形式的 IAC，其目標物及其類似物到達偵測器的濃度不至於因毛細管的內徑增加而下降得太明顯，所以較能忍受較大內徑的 otcc。文獻⁶⁹⁻⁷²曾提及 50 μm I.D.; 365 μm O.D. 的毛細管仍適合做成親和性 otcc，茲舉數例說明親和性 otcc 的製備及應用：

2000 年發表的文獻⁶⁹中，其毛細分析管的處理流程為：毛細管以 1.0 M KOH_(aq)、H₂O 和 0.1M HCl_(aq) 分別沖 3 h、10 min 及 30 min，再通入氮氣乾燥，之後於 90 °C 下，通入 5%(v/v) γ -glycidoxypyriltrimethoxysilane in a 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.5) 3 小時，再以 H₂O 沖洗 5 min，最後通入 2 mM Cibacron blue F3GA in 0.1M NaCO₃ (aq) 3 小時。製備出的親和性管柱用於分離牛的血清蛋白 (bovine serum albumin; BSA) 及 Lysozyme (Lys)，其流程是先用 10 mM tri-HCl_(aq) (pH 7.0) 作為導入樣品的緩衝液 (loading buffer)，再用含有 1.0 M NaCl, 10mM tri-HCl_(aq) (pH 7.0) 作為沖提液 (elution buffer)，與固定相沒有特殊作用力的 BSA 在 loading buffer 下被沖出，與固定相有特殊作用力的 Lys 在 elution buffer 下沖出，且 Lys 的訊號強度 (高度/半高寬) 比 BSA 強，所用之分析管長度為 60 cm，層析過程中壓力皆在 10 psi 以下。2001 年，Y. Liu 等人⁷³將 Enterhemorrhagic Escherichia coli serotype 0157:H7 的抗體鍵結到 20 cm 長，內徑為 250 μm 的毛細管內壁，作為生化反應器，以偵測 0157:H7 細菌，其步驟為：毛細管 (polymicro) 經過 1N NaOH_(aq)、1N HCl_(aq) 及 H₂O 逐步清洗後，隔夜烘乾，再通過 γ -(aminopropyl)trimethoxysilane 反應、甲醇清洗、戊二醛反應、磷酸鹽水溶液清洗、抗體進入毛細管耦合、磷酸鹽水溶液清洗，所製成的毛細管用於吸附 0157:H7 細菌，再通入酵素標誌的細菌抗體，最後通入酵素的受體，藉由偵測產物的吸收度而測定細菌的數目。

六、毛細免疫親和性層析之應用實例

相較於其他層析方法，免疫層析可以從極端複雜的環境中萃取、分辨及檢測目標物及其結構類似物，但唯一的缺憾是目前不被廣泛使用的抗體的市售價格相當昂貴，若非自己培養，要合成一支一般常用規格 (4.6 mm*25 cm) 的 HPLC 管柱所需的填充材料，需要幾十 mg 的抗體，光是購買抗體的費用相當高，若是自行培養抗體，因抗體的製備從抗原的設計與合成及免疫動物所需的時間，耗費許多研發時間與人力。由於製備毛細免疫親和性層析管柱比製作一般常用規格的 HPLC 管柱所需的抗體量少很多，可以避免花費大量的研發成本購買抗體，同時因於層析管柱的內徑縮小可以提高層析的解析度與檢測靈敏度，所以本實驗室正朝製備 HPLC 之毛細免疫親和性管柱 (Capillary immunoaffinity column; CIAC) 方向研發。

目前我們能夠以自製之兩支抗 D-MA 之 CIAC (內徑為 250 μm ，長度 15 cm) 安裝於 LC-MS 上，利用雙分析管柱交替取樣與檢測，可以於 20 分鐘內直接檢測尿液中安非他命及其結構類似物 (內含會造成免疫分析法偽陽性之感冒藥成份及俗稱搖頭丸之藥物) 共 7 種化合物，其中三種藥物為外銷旋混合物，其光學異構物亦能同時被分離檢測，尿液樣品不需衍生與萃取等繁雜的前置處理，只需先經過 0.45 μm 濾膜過濾後，即可直接注入 CIAC 檢測，不但檢體的量極微，移動相的流量也很低，同時整個檢測過程不需使用任何有毒之有機溶劑，完全符合綠化學的要求。

七、結 論

毛細免疫親和性層析由於具有高解析度、高靈敏度、極少量之移動相、極少量的檢體體積、不用繁雜的樣品前處理流程及容易與質譜儀搭配使用等諸多優點，不但符合綠化學的要求外，同時對於講求時效，目標物之環境非常複雜及極少量之檢體亦非常適用。此項技術可實際應用於動植物體液 (如病人血漿、尿液、腦脊髓液) 中有效成份、濫用藥物、農藥、酵素、癌症標記物等之檢測。

參考文獻

1. A. Gu'rbay; S. Aydin; G. Girgin; A.B. Engin; G. S'ahin. *Food Control*, **2006**, 17, 1.
2. Gabrijela Tavc~ar-Kalcher; Katarina Vrtac~; Uros~ Pestevs~ek; Anton Vengus~t. *Food Control*, **2005**, xxx, xxx.
3. N. Ali; N.H. Hashim; B. Saad; K. Safan; M. Nakajima; T. Yoshizawa. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, 43, 1763.
4. Maria Li'gia Martins; H. Marina Martins. *Int J Food Microbiol.* **2004**, 91, 315.
5. A.H.W. Abdulkadar; Abdulla A. Al-Ali; Afrah M. Al-Kildi; Jassim H. Al-Jedah. *Food Control*, **2004**, 15, 543.
6. O. Heudi; T. Kilinc; P. Fontannaz; E. Marley. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1101, 63.
7. D. Chan~; S.J. MacDonald; V. Boughtflower; P. Brereton. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1059, 13.
8. Margaret A. O'Leary; Jennifer J. Schneiderb; Geoffrey K. Isbister. *Toxicon*, **2004**, 44, 549.
9. J. Blesa; J.M. Soriano; J.C. Molto; J. Man~es. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 97, 221.
10. N. Ratolaa; P. Barrosb; T. Sim~oes; A. Cerdeirad; A. Ven~ancioe; A. Alves. *Talanta*, **2006**, xxx, xxx.
11. R. Lo Curtoa; T. Pellicano`a; F. Vilasia; P. Munafo`b; G. Dugo. *Food Chem.* **2004**, 84, 71.
12. C. Breraa; J.M. Sorianob; F. Debegnacha; M. Miraglia. *Microchem. J.* **2005**, 79, 109.
13. A. Tafuri; R. Ferracane; A. Ritieni. *Food Chem.* **2004**, 88, 487.
14. A. Pena a; M. Seifrtova'; C. Lino; I. Silveira; P. Solich. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, 44, 1449.
15. L. Monacia; F. Palmisanoa; R. Matrellab; G. Tantillo. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1090, 184.
16. Lin Li; Jin Yan; Mei-Ping Zhao. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1103, 350.
17. Tomohiro Sawa; Masayuki Tatemichi; Takaaki Akaike; Alain Barbin; Hiroshi Ohshima. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, 40, 711.
18. Houcine Mhadhbia; Samuel Ben-Rejebb; Chantal Cl'eroux; Annie Martela; Philippe Delahaut. *Talanta*, **2006**, xxx, xxx.
19. Milagro Reig; Leticia Mora; Jose' L. Navarro; Fidel Toldra. *Meat Sci.* **2006**, xxx, xxx.
20. R. Braunrath; M. Cichna. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1062, 189.
21. Angelo Visconti~; Veronica Maria Teresa Lattanzio; Michelangelo Pascale; Miriam Haidukowski. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1075, 151.
22. Jiebo Mia; Shan Wang; Xiaojie Ding; Zhenquan Guob; Meiping Zhaoa; Wenbao Chang. *J. Chromatogr. B*, **2006**, xxx, xxx.
23. Marijana Rucevic; James G. Clifton; Feilei Huang; Xuesong Li; Helen Callanan; Douglas C. Hixson; Djuro Josic. *J. Chromatogr. A*, **2006**, xxx, xxx.
24. P. Songsermsakula; G. Sontagb; M. Cichna-Marklb; J. Zenteka; E. Razzazi-Fazeli. *J. Chromatogr. B*, **2006**, xxx, xxx.
25. Leslie E. Edinboro; H. Thomas Karnes. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1083, 127.
26. Ping Su; Xin-Xiang Zhang~; Wen-Bao Chang. *J. Chromatogr. B*, **2005**, 816, 7.
27. Xiao-Hua Qi; Jian-Qiu Mi; Xin-Xiang Zhang~; Wen-Bao Chang. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 551, 115.
28. M.L. S'anchez-Mart'imeza; M.P. Aguilar-Caballosa; S.A. Ereminb; A.'omez-Hens. *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 553, 93.
29. Hei ke Hofstetter; Oliver Hofstetter. *Trends Analyt. Chem.* **2005**, 24, 869.
30. A.C. Lua; T.-Y. Chou. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 967, 191.
31. Ahai C. Lua; Yenny Sutono; Tsong-Yung Chou. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, xxx, xxx.
32. R.P.W. Scott; P.Kucera. *J. Chromatogr.* **1976**, 125, 251.
33. R.P.W. Scott; P.Kucera. *J. Chromatogr.* **1979**, 169, 51.
34. R.P.W. Scott; P.Kucera. *J. Chromatogr.* **1979**, 186, 475.
35. R.P.W. Scott; P.Kucera. *J. Chromatogr.* **1979**, 184, 27.
36. R.P.W. Scott; P.Kucera. *J. Chromatogr. Sci.* **1980**, 15, 352.
37. R. L. Moritz; G. E. Reid; L. D. Ward; R. J. Simpson. *Methods*, **1994**, 6, 213.
38. C. Legido-Quigley; N.W. Smith; D. Mallet. *J. Chromatogr. A*, **2002**, 976, 11.
39. A. Braithwaite; F. J. Smith. *Chromatographic Methods*, **1996**.
40. H.J. Cortes; C.D. Pfeiffer; B.E. Richter; T.S. Stevens. *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.* **1987**, 10, 446.
41. J.H. Knox; I.H. Grant. *Chromatographia*, **1991**, 32, 317.

- 42.B. Behnke; E. Grom; E. Bayer. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 716, 207.
- 43.C. Yan; D. Schanfelberger; F. Erni. *J. Chromatogr. A*, **1994**, 670, 15.
- 44.C. Yan; R. Dadoo; H. Zhao; R.N. Zare; D.J. Rakestraw. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2026.
- 45.C. Yan, R. Dadoo; R.N. Zare; D.J. Rakestraw; D.S. Anex. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2726.
- 46.C. Fujimoto; Y. Fujise. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2753.
- 47.L.A. Colon; Y. Guo; A. Fermier. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 461.
- 48.Y. Chen; G. Gerhardt; R. Cassidy. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 610.
- 49.X. Zhang; S. Huang. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 910, 13.
- 50.B. Behnke; J. Johansson; S. Zhang; E. Bayer; S. Nilsson. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 818, 257.
- 51.M.T. Dulay; R.P. Kulkarni; R.N. Zare. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 5103.
- 52.Q. Tang; B. Xin; M.L. Lee. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 837, 35.
- 53.Q. Tang; M.L. Lee. *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* **2000**, 23 73.
- 54.Q. Tang; N. Wu; M.L. Lee. *J. Microcol.* **2000**, Sep. 12, 6.
- 55.G. Chirica; V.T. Remcho. *Electrophoresis*, **1999**, 20, 50.
- 56.C. Fujimoto. *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* **2000**, 23, 89.
- 57.C.K. Ratnayake; C.S. Oh; M.P. Henry. *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* **2000**, 23, 81.
- 58.K. Cabrera; D. Lubda; H.-M. Minakuchi; K. Nakanishi. *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* **2000**, 23, 93.
- 59.M. Schmid; F. Bauml; A.P. Kohne; T. Welsch. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1999**, 837, 35.
- 60.M.J.E. Golay. *Gas Chromatography*, V. J. Coates, Ed. Academic Press, New York, **1958**, 1.
- 61.J.H. Knox; M. Gilbert. *J. Chromatogr.* **1979**, 186, 405.
- 62.J.H. Knox. *J. Chromatogr. Sci.* **1980**, 18, 453.
- 63.G. Guiochon. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1318.
- 64.P.P.H. Tock; G. Stegeman; R. Peerboom; H. Poppe; J.C. Kraak; K.K. Unger. *Chromatographia*, **1987**, 24, 617.
- 65.A.L. Crego; J.C. Diez-Masa; M.V. Dabrio. *Chromatographia*, **1993**, 65, 1615.
- 66.Y. Guo; L.A. Colon. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 2511.
- 67.J.W. Jorgenson, E.J. Guthrie. *J. Chromatogr.* **1983**, 255, 335.
- 68.M. Novotory. *Anal. Chem.* **1988**, 60, 500.
- 69.M. Ye; H. Zou; Z. Liu; Z. Lei; J. Ni. *Chinese Journal of Chromatography*, **2000**, 18, 529.
- 70.Y.D. Clonis; K. Jones; C.R. Lowe. *J. Chromatogr.* **1986**, 363, 31.
- 71.C.R. Lowe; M. Glad; P. Larsson; S. Ohlson; D.A.P. Small; T. Atkinson; K. Mosbach. *J. Chromatogr.* **1981**, 215, 303.
- 72.M. Ye; H. Zou; Z. Liu; Z. Lei; J. Ni. *J. Chromatogr. Sci.* **2000**, 38, 517.
- 73.Y. Liu; Y. Li. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5180.

The development and application of immunoaffinity chromatography

Tsong-Yung Chou*, Jie-Wei Chen, Fang-Jin Lee

Department of Laboratory Medicine and Biotechnology & Graduate Institute of Medical Biotechnology, Tzu Chi University, 701, Sec. 3, Chung-Yang Rd Hualien 970, Taiwan

Abstract

By applying immunoaffinity column (IAC) as analytical column prepared by packing the material immobilized with the antibody of the analyte, immunoaffinity chromatography could extract and determine simultaneously the analyte and its analogs from the sample whose environment is extreme complicate due to the specific and affinity between the immobilized antibody and the analyte. Compared to the traditional chromatography, immunoaffinity chromatography has two advantages, one is it could avoid tedious procedures for sample pretreatments before injecting into HPLC system and this results in saving the labor for sample treatment. Another is it could avoid utilizing toxic organic solvent for sample extraction, and this avoids the impacts of the environment protection and the risk of the operator health. Based on these two advantages, immunoaffinity chromatography is a time-saving and safety method especial for biofluid sample determination. In this article, we will introduce the literatures in which IAC was used for sample determination and discuss the development and application of IAC.

Key words: immunoaffinity column, immunoaffinity chromatography, immobilized antibody