

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014 年 12 月 18 日 (18.12.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/198113 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 1/34 (2006.01) *C07K 1/14* (2006.01)
B01D 15/04 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/090129
- (22) 国际申请日: 2013 年 12 月 20 日 (20.12.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201310237458.4 2013 年 6 月 14 日 (14.06.2013) CN
- (71) 申请人: 中国科学院大连化学物理研究所 (DALIAN INSTITUTE OF CHEMICAL PHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。
- (72) 发明人: 张丽华 (ZHANG, Lihua); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 赵群 (ZHAO, Qun); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 杨开广 (YANG, Kaiguang); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 方菲 (FANG, Fei); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。 张玉奎 (ZHANG, Yukui); 中国辽宁省大连市中山路 457 号, Liaoning 116023 (CN)。

(74) 代理人: 沈阳科苑专利商标代理有限公司 (SHENYANG PATENT & TRADEMARK AGENCY ACADEMIA SINICA); 中国辽宁省沈阳市和平区三好街 24 号, Liaoning 110004 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: METHOD FOR REMOVING FROM A SOLUTION SAMPLE IONIC LIQUID CONTAINING LONG ALKYL CHAINS

(54) 发明名称: 溶液样品中含长烷基链的离子液体的去除方法

(57) Abstract: A method for removing ionic liquid containing long alkyl chains, comprising the following steps: a) alkalizing a solution containing ionic liquid (pH $\geq$ 8); b) using a cation exchange material as an adsorbent to remove ionic liquid containing long alkyl chains; c) collecting the solution after removal of ionic liquid. The method can amply remove from a solution sample ionic liquid containing long alkyl chains, has the advantages of simplicity, efficiency, and rapidity, and also has broad prospects for application in proteomics, polymer chemistry, and liposome metabolomics.

(57) 摘要: 一种含长烷基链的离子液体的去除方法, 包括以下步骤: a) 将含有离子液体的溶液调至碱性 (pH $\geq$ 8); b) 采用阳离子交换材料作为吸附剂, 去除含长烷基链的离子液体; c) 收集去除离子液体后的溶液。该方法能很好地去除溶液中的含长烷基链的离子液体, 具有简单、高效、快速的优点, 并在蛋白质组学、高分子化学及脂质体代谢组学方面有着广阔的应用前景。



WO 2014/198113 A1

溶液样品中含长烷基链的离子液体的去除方法

技术领域

5 本发明涉及一种含长烷基链的离子液体的去除方法及其应用,可实现溶液中含长烷基链的离子液体的有效去除,具有简单、高效、快速的优点,并且该方法可以广泛应用于蛋白质组学、高分子化学及脂质体代谢组学的研究中。

背景技术

10 膜蛋白质对执行细胞内外物质交换、细胞识别与免疫应答、信号传导和调控以及能量传递等功能起着重要作用。真核生物中 1/3 的蛋白均整合在膜上。此外,膜蛋白质在药物研究中也起着相当重要的作用,在已知的和正在研究的药物靶标中大约有 70% 为膜蛋白质。然而,由于膜蛋白质疏水性强,导致其溶解性和酶解效率较差,分析困难。因此,选择一种对膜蛋白质具有高溶解能力的溶剂是膜蛋白质研究的先决条件。

15 近年来,离子液体作为一种极具应用前景的绿色溶剂受到越来越多的关注。离子液体是完全由阴阳离子组成,通常在室温下表现为液体或是熔点小于 100 °C 的盐类。离子液体具有良好的溶剂性、不挥发、热稳定、液程宽、阴阳离子可设计性等优点,已经被广泛应用在化学合成、电化学、萃取分离、材料制备等诸多领域。由于其良好的溶解能力,近年来离子液体成为膜蛋白质溶解的新型溶剂(Sun, L.L.; Tao, D.Y.; Han, B.; Ma, J. F.; Zhu, G. J.; Liang, Z.; Shan, Y. C.; Zhang, L. H.; Zhang, Y. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 3387-3397.)。

20 “Bottom-up”技术是目前蛋白质组学分析鉴定中最常用的技术,该技术是先将蛋白质酶解成肽段,然后通过一维或者多维分离技术进行分离及在线质谱鉴定。在膜蛋白质分析中,为了膜蛋白质的增溶,添加的离子液体等增溶剂会严重影响蛋白质分析的质谱信号。因此质谱分析前,需要对蛋白质样品进行离子液体等增溶剂的去除,以获得理想的质谱信号。

发明内容

25 为了解决上述问题,本发明的目的在于发展一种含长烷基链的离子液体的去除方法,通过该方法能高效、快速、简便地去除溶液中的离子液体,从而与后续的分析过程相兼容,不对后续的分析造成不利的影响。

为实现上述目的,本发明采用的技术方案为:

30 溶液样品中含长烷基链的离子液体的去除方法,将含有长烷基链的离子液体的样品溶液用碱性溶液调至 pH≥8 的碱性环境;然后采用阳离子交换材料作为吸附剂,去除含长烷基链的离子液体,最后将吸附剂和溶液分离,收集溶液。

35 含长烷基链的离子液体可为:阳离子部分为烷基链部分,为含 6 个碳或 7 个以上碳的咪唑类、吡啶类、季铵类、或季磷类阳离子;阴离子部分为 Cl⁻、Br⁻、I⁻、NO₃⁻、ClO₄⁻、AlCl₄⁻、BF₄⁻、PF₄⁻、CF₃COO⁻、CF₃SO₃⁻、(CF₃SO₂)₂N⁻或 SbF₆⁻。

将含有长烷基链的离子液体的样品溶液用碱性溶液调至 pH 为 8-14 的碱性环境。

含有长烷基链的离子液体的样品溶液可为:细胞提取液、胞浆提取液、血浆提取液、蛋白质溶液、多肽溶液、脂质物溶液或呈电负性的聚合物溶液。

40 调节 pH 至碱性环境所采用的碱性溶液为 pH 为 9-14 的碳酸氢铵缓冲盐溶液、pH 为 9-14 的磷酸缓冲盐溶液、pH 为 9-14 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液、氨水、碳酸钠溶液、或氢氧化钠溶液。

阳离子交换材料为含有磺酸基团和/或磷酸基团的硅胶或聚合物基质材料(如:聚丙烯酸酯类基质、聚苯乙烯类基质、聚丙烯酰胺类基质);材料可以是颗粒材料或者整体材料。

将吸附剂和样品溶液接触和分离的方式可以为：

将吸附剂固载于固相载体上或填充于中空容器中，将含有离子液体的样品溶液通过固相载体或中空容器，并与吸附剂接触后，直接收集；

或将吸附剂和样品溶液混合接触后，将吸附剂通过离心沉淀的方式，与含有离子液体的溶液分离；

或将吸附剂包裹于磁性颗粒上，将吸附剂和样品溶液混合接触后，通过磁力作用，与含有离子液体的样品溶液分离。

固相载体为：表面积为 1cm^2 - 10m^2 ，形状为长方体、正方体、圆锥体或圆柱体中一种或二种以上，材质为聚合物材料，具体为硅胶、纤维素膜、聚醚砜膜、树脂、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶和磁性复合材料。

中空容器为：内部空腔径向横截面直径为 $50\text{ }\mu\text{m}$ - 5 cm 的不锈钢管、 20 - $1000\text{ }\mu\text{l}$ 移液器枪头、 1 - 200 ml 固相萃取（SPE）管、 1 - 200 ml 注射器针管、 50 - $500\text{ }\mu\text{m}$ 内径毛细管或注射器滤膜腔体。

所述样品溶液为蛋白质样品、脂质体样品及高分子样品中一种或二种以上混合，该方法可用于蛋白质样品、脂质体样品及高分子样品的分析中。

具体：

1、将含有长烷基链的离子液体的样品溶液，用 pH 为 9 - 14 碳酸氢铵缓冲盐溶液、磷酸缓冲盐溶液、三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液，氨水、碳酸钠溶液、或氢氧化钠溶液碱性溶液调至 $\text{pH}>8$ 的碱性环境；

2、采用含有磺酸基团和/或磷酸基团的硅胶或聚合物基质的阳离子交换材料作为吸附剂，吸附溶液中含长烷基链的离子液体。若吸附剂固载于固相载体上或填充于中空容器中，则将含长烷基链离子液体的样品溶液以 10 - $1000\text{ }\mu\text{L}$ 的流速直接通过吸附剂即可；若吸附剂为未被固定化的颗粒，则直接将吸附剂加入含长烷基链离子液体的溶液中，振荡 3 - 10 min 。

3、若吸附剂固载于固相载体上或填充于中空容器中，则直接收集流出液，即为去除离子液体后的溶液；若吸附剂为未被固定化的颗粒，则通过离心的方法（ 100 - 30000g ）分离吸附剂和溶液，收集溶液部分，即为去除离子液体后的溶液。

本发明具有如下优点：

1. 去除效率高。 $\text{pH}>8$ 的碱性范围内，绝大部分蛋白质或肽段成电负性，由于所带负电荷和离子液体中含有长烷基链的阳离子的正电荷相反，采用强阳离子交换材料，含有长烷基链的离子液体被保留，而蛋白质或肽段不保留，从而将离子液体和蛋白质/肽段分开。

2. 操作方便、快捷。强阳离子交换材料只需和含长烷基链的离子液体充分接触，即可将两者分离。随后，采用离心或磁性分离等手段，即可回收去除离子液体后的溶液。若强阳离子交换材料被填充于柱管内或被固定化，将含离子液体的溶液通过阳离子交换材料，收集流出液即为去除离子液体后的溶液。

附图说明

图 1 为 BSA 酶解产物的 MALDI-TOF 质谱图。图 1. 用强阳离子交换材料为吸附剂（A）将其填充于捕集柱内（B）直接放入溶液中，去除离子液体后的 BSA 酶解产物的质谱图；（C）不含离子液体的 BSA 酶解产物的质谱图；（D）含离子液体的 BSA 酶解产物的质谱图。

具体实施方式

实施例 1

1. 牛血清白蛋白 (BSA) 样品预处理: 将 1mg BSA 溶解于 1mL 4% (4g/100 mL) 的氯化 1-十二烷基-3-甲基咪唑 (C12Im-Cl) 的 50 mM 碳酸氢铵溶液 (ABC) 中, 90℃ 下热变性 10 min 后, 加入 10 mM 二巯苏糖醇 (DTT) 溶液, 56℃ 下反应 60 min 进行蛋白质的还原处理后, 通入 30 mM 碘乙酰胺 (IAA) 溶液, 室温下避光反应 30 min 后进行蛋白质的烷基化处理。最后, 按蛋白质/胰蛋白酶: 25/1, 加入 40 μg 的胰蛋白酶 (溶于 50 mM 碳酸氢铵溶液, pH 8.0), 37℃ 酶解 12 小时。最后, 加入 10 μl 甲酸酸化, 终止酶解。

2. 含长烷基链的离子液体的去除: 将强阳离子交换材料 (日本东曹达, TSK-GEL SP-5PW, 10 μm, 1000 Å) 填充于抛光不锈钢捕集柱柱管内 (内径 4.6 cm, 长 1cm)。向摩尔浓度为 1mg/mL BSA 的酶解产物 (100 μL, 溶于 4% C12Im-Cl 的 50 mM ABC) 加入 400 μL 1mM 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲盐溶液 (Tris-HCl, pH 9.5)。随后, 将上述 0.2 mg/mL BSA 的酶解产物用 1mM Tris-HCl, pH 9.5 作为载流液, 以 1mL/min 的流速, 用泵推动, 通过强阳离子交换捕集柱, 收集流出液, 即为去除离子液体后的溶液。

3. MALDI-TOF 分析: 将收集的去除离子液体后的 BSA 酶解产物溶液冻干后, 重溶于 500 μL 0.1% (体积分数) 三氟乙酸水溶液, 即 0.2 mg/mL BSA 酶解产物。以 2-氰基-4-羟基肉桂酸 (7mg/mL, 溶于含 0.1% (体积分数) 三氟乙酸的 60% 乙腈水溶液) 为基质, 按体积比 1:1 混合, 点样 2 μL, 自然风干后, MALDI-TOF 检测。质谱图见图 1 (A), 鉴定结果见表 1。

实施例 2

1. 牛血清白蛋白 (BSA) 样品预处理: 将摩尔浓度为 1mg BSA 溶解于 1mL 4% (4g/100 mL) 的氯化 1-十二烷基-3-甲基咪唑 (C12Im-Cl) 的 50 mM 碳酸氢铵溶液 (ABC) 中, 90℃ 下热变性 10 min 后, 加入 10 mM 二巯苏糖醇 (DTT) 溶液, 56℃ 下反应 60 min 进行蛋白质的还原处理后, 通入 30 mM 碘乙酰胺 (IAA) 溶液, 室温下避光反应 30 min 后进行蛋白质的烷基化处理。最后, 按蛋白质/胰蛋白酶: 25/1 加入, 40 μg 的胰蛋白酶 (溶于 50 mM 碳酸氢铵溶液, pH 8.0), 37℃ 酶解 12 小时。最后, 加入 10 μl 甲酸酸化, 终止酶解。

2. 含长烷基链的离子液体的去除: 向 1mg/mL BSA 的酶解产物 (100 μL, 溶于 4% C12Im-Cl 的 50 mM ABC) 加入 400 μL 1mM 三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲盐溶液 (Tris-HCl, pH 9.5)。随后, 向上述溶液中加入 2 mg 强阳离子交换材料 (日本东曹达, TSK-GEL SP-5PW, 10 μm, 1000 Å), 震荡 3min 后, 14 000g 离心 5min。取上清, 即为去除离子液体后的溶液。

3. MALDI-TOF 分析: 将收集的去除离子液体后的 BSA 酶解产物溶液冻干后, 重溶于 500 μL 0.1% (体积分数) 三氟乙酸水溶液, 即 0.2 mg/mL BSA 酶解产物。以 2-氰基-4-羟基肉桂酸 (7mg/mL, 溶于含 0.1% (体积分数) 三氟乙酸的 60% 乙腈水溶液) 为基质, 按体积比 1:1 混合, 点样 2 μL, 自然风干后, MALDI-TOF 检测。质谱图见图 1 (B), 鉴定结果见表 1。

对照组 1

用不含长烷基链的离子液体的溶剂溶解 BSA，进行样品预处理：将 1mg BSA 溶解于 1mL 50 mM 碳酸氢铵溶液（ABC）中，90℃下热变性 10 min 后，加入 10 mM 二硫苏糖醇（DTT）溶液，56℃下反应 60 min 进行蛋白质的还原处理后，通入 30 mM 碘乙酰胺（IAA）溶液，室温下避光反应 30 min 后进行蛋白质的烷基化处理。最后，按蛋白质/胰蛋白酶：25/1，加入 40 μg 的胰蛋白酶（溶于 50 mM 碳酸氢铵溶液，pH 8.0），37℃酶解 12 小时。最后，加入 10 μl 甲酸酸化，终止酶解。将 BSA 酶解产物稀释至 0.2 mg/mL，以 2-氨基-4-羧基肉桂酸（7mg/mL，溶于含 0.1% （体积分数）三氟乙酸的 60% 乙腈水溶液）为基质，按体积比 1:1 混合，点样 2 μL，自然风干后，MALDI-TOF 检测。质谱图见图 1（C），鉴定结果见表 1。

对照组 2

用含长烷基链离子液体的 BSA 酶解产物溶液为对照组：将 1mg BSA 溶解于 1mL 4%（4g/100 mL）的氯化 1-十二烷基-3-甲基咪唑（C12Im-Cl）的 50 mM 碳酸氢铵溶液（ABC）中，90℃下热变性 10 min 后，加入 10 mM 二硫苏糖醇（DTT）溶液，56℃下反应 60 min 进行蛋白质的还原处理后，通入 30 mM 碘乙酰胺（IAA）溶液，室温下避光反应 30 min 后进行蛋白质的烷基化处理。最后，按蛋白质/胰蛋白酶：25/1，加入 40 μg 的胰蛋白酶（溶于 50 mM 碳酸氢铵溶液，pH 8.0），37℃酶解 12 小时。最后，加入 10 μl 甲酸酸化，终止酶解。将 BSA 酶解产物稀释至 0.2 mg/mL，以 2-氨基-4-羧基肉桂酸（7mg/mL，溶于含 0.1% （体积分数）三氟乙酸的 60% 乙腈水溶液）为基质，按体积比 1:1 混合，点样 2 μL，自然风干后，MALDI-TOF 检测。质谱图见图 1（D），鉴定结果见表 1。

表 1. BSA 酶解产物的鉴定结果

	鉴定的肽段数	鉴定的序列覆盖率
图 1（A）	32	55%
图 1（B）	30	51%
图 1（C）	30	53%
图 1（D）	/	/

通过表 1 和图 1 可以看出，通过该发明的方法，含有长烷基链的离子液体可以从溶液中高效去除，从而不影响质谱的检测。

权 利 要 求 书

1. 溶液样品中含长烷基链的离子液体的去除方法, 其特征在于: 将含有长烷基链的离子液体的样品溶液用碱性溶液调至 $\text{pH} \geq 8$ 的碱性环境; 然后采用阳离子交换材料作为吸附剂, 去除含长烷基链的离子液体, 最后将吸附剂和溶液分离, 收集溶液。

5 2. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 含长烷基链的离子液体可为: 阳离子部分为烷基链部分, 为含 6 个碳或 7 个以上碳的咪唑类、吡啶类、季铵类、或季磷类阳离子; 阴离子部分为 Cl^- 、 Br^- 、 I^- 、 NO_3^- 、 ClO_4^- 、 AlCl_4^- 、 BF_4^- 、 PF_6^- 、 CF_3COO^- 、 CF_3SO_3^- 、 $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$ 或 SbF_6^- 。

10 3. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 将含有长烷基链的离子液体的样品溶液用碱性溶液调至 pH 为 8-14 的碱性环境。

4. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 含有长烷基链的离子液体的样品溶液可为: 细胞提取液、胞浆提取液、血浆提取液、蛋白质溶液、多肽溶液、脂质物溶液或带负电性的聚合物溶液。

15 5. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 调节 pH 至碱性环境所采用的碱性溶液为 pH 为 9-14 的碳酸氢铵缓冲盐溶液、 pH 为 9-14 的磷酸缓冲盐溶液、 pH 为 9-14 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液、氨水、碳酸钠溶液、或氢氧化钠溶液。

6. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 阳离子交换材料为含有磺酸基团和/或磷酸基团的硅胶或聚合物基质材料 (聚丙烯酸酯类基质、聚苯乙烯类基质、聚丙烯酰胺类基质); 材料可以是颗粒材料或者整体材料。

20 7. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 将吸附剂和样品溶液接触和分离的方式可以为:

将吸附剂固载于固相载体上或填充于中空容器中, 将含有离子液体的样品溶液通过固相载体或中空容器, 并与吸附剂接触后, 直接收集;

25 或将吸附剂和样品溶液混合接触后, 将吸附剂通过离心沉淀的方式, 与含有离子液体的溶液分离;

或将吸附剂包裹于磁性颗粒上, 将吸附剂和样品溶液混合接触后, 通过磁力作用, 与含有离子液体的样品溶液分离。

8. 根据权利要求 6 所述的去除方法, 其特征在于:

30 固相载体为: 表面积为 1cm^2 - 10m^2 , 形状为长方体、正方体、圆锥体或圆柱体中一种或二种以上, 材质为聚合物材料, 具体为硅胶、纤维素膜、聚醚砜膜、树脂、葡聚糖凝胶、琼脂糖凝胶和磁性复合材料。

中空容器为: 内部空腔径向横截面直径为 $50\text{ }\mu\text{m}$ - 5 cm 的不锈钢管、 20 - $1000\text{ }\mu\text{l}$ 移液器枪头、 1 - 200 ml 固相萃取 (SPE) 管、 1 - 200 ml 注射器针管、 50 - $500\text{ }\mu\text{m}$ 内径毛细管或注射器滤膜腔体。

35 9. 根据权利要求 1 所述的去除方法, 其特征在于: 所述样品溶液为蛋白质样品、脂质体样品及高分子样品中一种或二种以上混合, 该方法可用于蛋白质样品、脂质体样品及高分子样品的分析中。

40

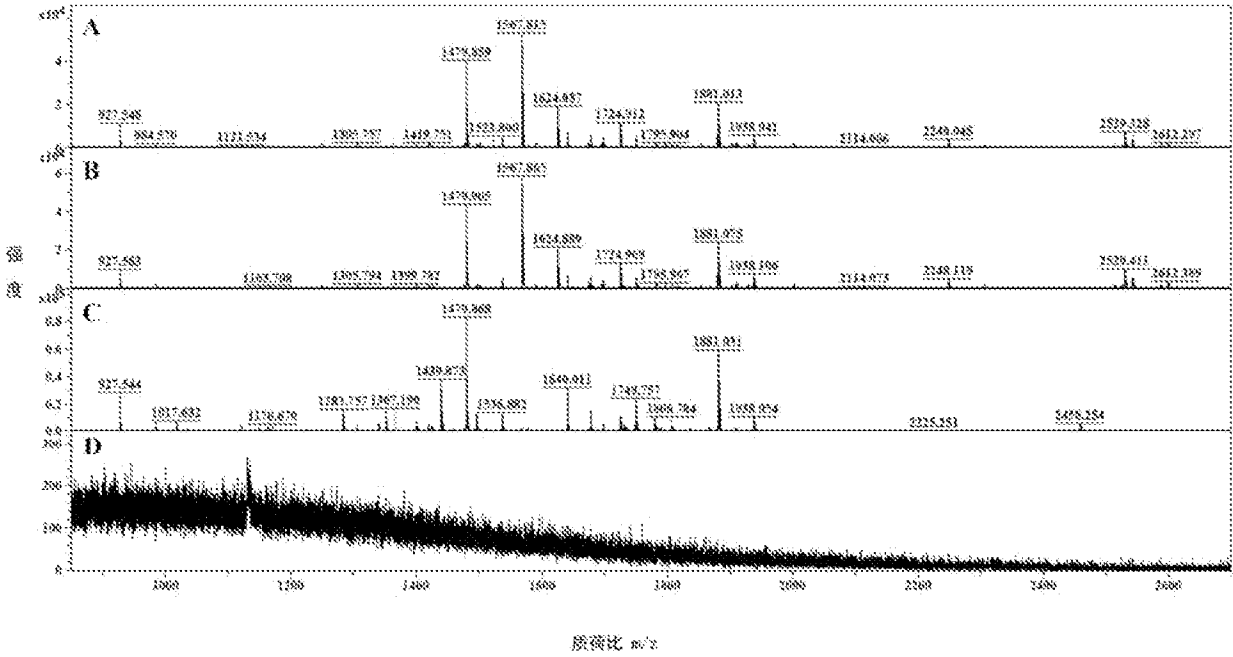


图 1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/090129**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: G01N 1; B01D 15; C07K 1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CPRSABS, VEN: alkyl, sodium, positive ion, adsor+, cell, protein, plasma

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102924565A (UPFRONT CHROMATOGRAPHY A/S), 13 February 2013 (13.02.2013), description, pages 3-66	1-9
A	CN 1597039 A (SICHUAN INDUSTRIAL INSTITUTE OF ANTIBIOTICS, CHINA NATIONAL PHARMACEUTICAL GROUP CORPORATION et al.), 23 March 2005 (23.03.2005), the whole document	1-9
A	EP 2321336 A1 (GRIFOLS THERAPEUTICS INC. et.al), 18 May 2011 (18.05.2011), the whole document	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 February 2014 (18.02.2014)

Date of mailing of the international search report

27 February 2014 (27.02.2014)

Name and mailing address of the ISA/CN:

State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

BIAN, XinTelephone No.: (86-10) **62085677**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/090129

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102924565 A	13.02.2013	None	
CN 1597039 A	23.03.2005	None	
EP 2321336 A1	18.05.2011	WO 2010009388 A1	21.01.2010
		AU 2009270723 A1	21.01.2010
		CA 2730018 A1	21.01.2010
		MXPA 11000666 A1	31.03.2010
		CN 102099369 A	15.06.2011
		US 2011237781 A1	29.09.2011
		HK 1156043 A0	01.06.2012
		NZ 590257 A	31.08.2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/090129

According to International Patent Classification (IPC):

G01N 1/34 (2006.01) i

B01D 15/04 (2006.01) i

C07K 1/14 (2006.01) i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2013/090129

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: G01N1; B01D15; C07K1

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CPRSABS, VEN: 烷基, 阳离子, 吸附, 细胞, 蛋白质, 血浆, sodium, positive ion, adsor+, cell, protein, plasma

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 102924565A (厄普弗朗特色谱公司) 13.02 月 2013 (13.02.2013) 说明书第 3—66 页	1—9
A	CN1597039A (中国医药集团总公司四川抗菌素工业研究所,等) 23.03 月 2005 (23.03.2005) 全文	1—9
A	EP2321336A1 (GRIFOLS THERAPEUTICS INC, et.al) 18.05 月 2011 (18.05.2011) 全文	1—9

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

18.02 月 2014 (18.02.2014)

国际检索报告邮寄日期

27.2 月 2014 (27.02.2014)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

边昕

电话号码: (86-10) 62085677

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/090129

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 102924565A	13.02.2013	无	
CN1597039A	23.03.2005	无	
EP2321336A1	18.05.2011	WO2010009388A1	21.01.2010
		AU2009270723A1	21.01.2010
		CA2730018A1	21.01.2010
		MXPA11000666A1	31.03.2010
		CN102099369A	15.06.2011
		US2011237781A1	29.09.2011
		HK1156043A0	01.06.2012
		NZ590257A	31.08.2012

按照国际专利分类(IPC):

G01N 1/34 (2006.01) i,

B01D 15/04 (2006.01) i

C07K1/14 (2006.01) i