



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106885900 A

(43)申请公布日 2017.06.23

(21)申请号 201710250198.2

(22)申请日 2017.04.17

(71)申请人 新疆医科大学

地址 830011 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市  
市新市区新医路393号新疆医科大学  
科研处

(72)发明人 李新霞 吴晓霞 王玉文 李久彤  
张唯

(74)专利代理机构 乌鲁木齐合纵专利商标事务  
所 65105

代理人 褚志武 汤建武

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法

(57)摘要

本发明涉及牛奶检测技术领域,是一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法;该基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,按下述步骤进行:第一步,将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处,得到卡那霉素检测卡。本发明测定牛奶中卡那霉素的检测限为 $0.2003 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,经实验选择的最优加样量为 $80 \mu\text{L}$ ,最优反应时间为 $8\text{min}$ ;本发明灵敏度高、反应时间短、操作简便,可实现牛奶中卡那霉素的现场快速定量检测,使本发明广泛应用于食品安全领域奠定了基础。

1. 一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,其特征在于按下述步骤进行:第一步,将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处,得到卡那霉素检测卡;第二步,取待检测样品200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素检测卡上的加样孔内,室温下层析8min;第三步,层析后将卡那霉素检测卡插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪的显示屏上就会显示出待检测样品名称和待检测样品中卡那霉素的浓度。

2. 根据权利要求1所述的基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,其特征在于卡那霉素标准曲线方程按下述方法得到:第一步,卡那霉素储备液的配置,取卡那霉素标准物质,用PBS配成1 $\mu$ g/mL的卡那霉素溶液,得到卡那霉素储备液;第二步,卡那霉素系列浓度标准溶液的配置,将卡那霉素储备液用标准牛奶样依次配成10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL和60ng/mL的卡那霉素系列溶液,得到卡那霉素系列浓度标准溶液;第三步,取标准牛奶样200 $\mu$ L、卡那霉素系列浓度标准溶液各200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素试纸条上的加样孔内,室温下层析8min;第四步,层析后将卡那霉素试纸条插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪扫描卡那霉素试纸条上的T线和C线,获得样品 $F_1/F_0$ 的比值;第五步,以溶液中卡那霉素的浓度为横坐标,相对应的 $F_1/F_0$ 为纵坐标,得到卡那霉素标准曲线方程 $y = -0.0002x^2 + 0.0198x + 0.2171$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,其特征在于标准牛奶样为经检测不含有卡那霉素的牛奶样。

4. 根据权利要求1或2所述的基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,其特征在于待检测样品为待检测牛奶。

5. 根据权利要求3所述的基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,其特征在于待检测样品为待检测牛奶。

## 基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及牛奶检测技术领域,是一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法。

### 背景技术

[0002] 卡那霉素(Kanamycin, KaA)是一种氨基糖苷类抗生素药物,水溶性好,价格便宜,抗菌谱广。临床上主要肌注用于敏感菌所致的系统感染,如肺炎、败血症、尿路感染等。作为兽药,经奶牛乳腺管注射给药,用来治疗奶牛的多种疾病。然其在体内代谢较慢,挤奶过程中经乳汁排出,导致生鲜乳中抗生素残留,对消费者引起机体的过敏反应或抗药性。各国都对其做出限量要求,中华人民共和国农业部公告第253号-2002牛奶中最高残留限量为100ng/mL。

[0003] 在中华人民共和国国家标准GB/T4789.27-2008中鲜乳中卡那霉素残留的检验方法为嗜热链球菌抑制法和嗜热脂肪芽孢杆菌抑制法。文献报道有酶联免疫吸附法(ELISA)、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、胶体金免疫层析法。嗜热链球菌抑制法和嗜热脂肪芽孢杆菌抑制法价格低廉,但操作繁琐,重现性差;免疫亲和柱-液相色谱法、免疫亲和柱液相色谱串联质谱法等,这类方法灵敏度高,特异性好,但是免疫亲和柱需低温保存、样品前处理程序繁琐,且此类仪器没有便携性;ELISA方法灵敏度较高、快速、经济,但在检测实验过程需多次洗板,重复性较差,试剂需要低温保存等,不适合现场快速检测,适用于实验室大量样本初筛;胶体金免疫层析因快速、简便且经济实用,在食品检测的大量样本筛查中表现出较强的优势,但只能用于定性检测,而不能进行定量,筛选后的阳性样本需送实验室进行进一步定量分析。

### 发明内容

[0004] 本发明提供了一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,克服了上述现有技术之不足,其能有效解决现有鲜乳中卡那霉素残留的检验方法存在样品前处理过程繁琐、重现性差、不适合现场快速检测和不能进行定量分析的问题。

[0005] 本发明的技术方案是通过以下措施来实现的:一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,按下述步骤进行:第一步,将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处,得到卡那霉素检测卡;第二步,取待检测样品200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素检测卡上的加样孔内,室温下层析8min;第三步,层析后将卡那霉素检测卡插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪的显示屏上就会显示出待检测样品名称和待检测样品中卡那霉素的浓度。

[0006] 下面是对上述发明技术方案的进一步优化或/和改进:

[0007] 上述卡那霉素标准曲线方程按下述方法得到:第一步,卡那霉素储备液的配置,取卡那霉素标准物质,用PBS配成1 $\mu$ g/mL的卡那霉素溶液,得到卡那霉素储备液;第二步,卡那

霉素系列浓度标准溶液的配制,将卡那霉素储备液用标准牛奶样依次配成10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL和60ng/mL的卡那霉素系列溶液,得到卡那霉素系列浓度标准溶液;第三步,取标准牛奶样200 $\mu$ L、卡那霉素系列浓度标准溶液各200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素试纸条上的加样孔内,室温下层析8min;第四步,层析后将卡那霉素试纸条插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪扫描卡那霉素试纸条上的T线和C线,获得样品 $F_1/F_0$ 的比值;第五步,以溶液中卡那霉素的浓度为横坐标,相对应的 $F_1/F_0$ 为纵坐标,得到卡那霉素标准曲线方程 $y = -0.0002x^2 + 0.0198x + 0.2171$ 。

[0008] 上述标准牛奶样为经检测不含有卡那霉素的牛奶样。

[0009] 上述待检测样品为待检测牛奶。

[0010] 本发明测定牛奶中卡那霉素的检测限为0.2003 $\mu$ g/kg,经实验选择的最优加样量为80 $\mu$ L,最优反应时间为8min;本发明灵敏度高、反应时间短、操作简便,可实现牛奶中卡那霉素的现场快速定量检测,使本发明广泛应用于食品安全领域奠定了基础。

### 附图说明

[0011] 附图1为现有卡那霉素试纸条的背景荧光猝灭-免疫层析检测示意图。

[0012] 附图2为本发明卡那霉素标准曲线。

[0013] 附图3为本发明卡那霉素检测卡和荧光免疫分析仪的立体结构示意图。

### 具体实施方式

[0014] 本发明不受下述实施例的限制,可根据本发明的技术方案与实际情况来确定具体的实施方式。

[0015] 实施例1,该基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法,按下述步骤进行:第一步,将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处,得到卡那霉素检测卡;第二步,取待检测样品200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素检测卡上的加样孔内,室温下层析8min;第三步,层析后将卡那霉素检测卡插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪的显示屏上就会显示出待检测样品名称和待检测样品中卡那霉素的浓度。

[0016] 实施例2,卡那霉素标准曲线方程按下述方法得到:第一步,卡那霉素储备液的配置,取卡那霉素标准物质,用PBS配成1 $\mu$ g/mL的卡那霉素溶液,得到卡那霉素储备液;第二步,卡那霉素系列浓度标准溶液的配制,将卡那霉素储备液用标准牛奶样依次配成10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL和60ng/mL的卡那霉素系列溶液,得到卡那霉素系列浓度标准溶液;第三步,取标准牛奶样200 $\mu$ L、卡那霉素系列浓度标准溶液各200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素试纸条上的加样孔内,室温下层析8min;第四步,层析后将卡那霉素试纸条插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪扫描卡那霉素试纸条上的T线和C线,获得样品 $F_1/F_0$ 的比值;第五步,以溶液中卡那霉素的浓度为横坐标,相对应的 $F_1/F_0$ 为纵坐标,得到卡那霉素标准曲线方程 $y = -0.0002x^2 + 0.0198x + 0.2171$ 。

[0017] 实施例3,作为上述实施例的优化,标准牛奶样为经检测不含有卡那霉素的牛奶样。

[0018] 实施例4,作为上述实施例的优化,待检测样品为待检测牛奶。

[0019] 现有卡那霉素试纸条的背景荧光猝灭-免疫层析检测示意图见图1所示,图1中,1.小试杯底部固定有胶体金标记的目标物抗体(金标抗体)和胶体金标记的羊抗鼠抗体,2.供试品溶液进行层析的样品垫,3.包被有“目标物抗原-牛血清白蛋白(BSA)偶联物”的测试线(T线),4.包被有“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白(BSA)偶联物”控制线(C线),5.带有背景荧光 $F_0$ 的硝酸纤维素膜;图1中,底部固定有胶体金标记的目标物抗体(金标抗体)和胶体金标记的羊抗鼠抗体的小试杯,固定有荧光试剂的硝酸纤维素膜荧光区(可产生背景荧光 $F_0$ ),在荧光区包被有“目标物抗原-牛血清白蛋白偶联物”的测试线(T线),包被有“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物”的控制线(C线)。样品检测原理为:将一定量样品溶液,加入固定有金标抗体小试杯中,混匀(样品溶液中的待测目标物-卡那霉素抗原与金标抗体特异性结合),吸取一定量的混匀溶液滴加至样品垫上,通过毛细管作用进行层析。当混合溶液到达T线处,剩余的金标抗体与T线处的目标物-卡那霉素抗原结合,形成抗原-金标抗体复合物,被截留在T线上,使背景荧光猝灭,以T线处荧光强度的测量值记为 $F_1$ ,荧光猝灭程度( $F_1/F_0$ )与供试品中待测目标物含量有关。当供试品中目标物浓度大时,结合小试杯中金标抗体的量就多,小试杯中剩余的金标抗体与T线处“目标物抗原-牛血清白蛋白偶联物”结合的就少,猝灭程度就弱, $F_1/F_0$ 的值就大。 $F_1/F_0$ 随待测物浓度增大而增大,零值样本 $F_1/F_0$ 值最小。为对试纸条进行质控,在具有背景荧光的硝酸纤维素膜上还固定了“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物”(C线),用于对试纸条进行质控,当上述混合溶液继续前行到达C线处,金标羊抗鼠抗体与C线处的“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物”结合,使C线处的背景荧光发生猝灭。说明试纸条质量合格。

[0020] 本发明试验如下:

[0021] 1.实验部分

[0022] 1.1仪器与材料

[0023] 荧光免疫分析仪(ZC2015-0797,上海鑫谱生物科技有限公司);

[0024] 卡那霉素标准物质(KaA,10ppm,上海鑫谱生物科技有限公司,批号:20160908);卡那霉素试纸条、固定有卡那霉素金标抗体的小试杯(上海鑫谱生物科技有限公司,批号:20160926);

[0025] 标准牛奶样(经检测未检出卡那霉素,上海荣辉生物科技有限公司)。

[0026] 1.2牛奶供试品

[0027] 为了验证背景荧光猝灭-免疫层析法和国标规定方法的差异,本实验在标准牛奶样中人为添加一定量的卡那霉素标准物质,制成含卡那霉素100ng/mL、60ng/mL和50ng/mL的供试品,依次记为001、002和003。

[0028] 1.3溶液的配制

[0029] 卡那霉素储备液的制备:将卡那霉素标准物质溶液(10ppm),用PBS配成1 $\mu$ g/mL的溶液,得到卡那霉素储备液。

[0030] 卡那霉素系列浓度标准溶液:将1 $\mu$ g/mL的卡那霉素储备液,用标准牛奶样配成10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL和60ng/mL的卡那霉素系列溶液,得到卡那霉素系列浓

度标准溶液。

## [0031] 2.方法与结果

### [0032] 2.1反应时间与加样量的确定

#### [0033] 2.1.1加样量的确定

[0034] 取四份标准牛奶样,每份200 $\mu$ L,分别加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后依次从四个固定有金标抗体的小试杯中吸60 $\mu$ L、80 $\mu$ L、90 $\mu$ L、100 $\mu$ L分别加入三个卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,层析后将卡那霉素试纸条插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,记录 $F_1/F_0$ 的值,见表1所示。

[0035] 从表1可以看出,当加样量为60 $\mu$ L时,样品只层析到一半;当加样量为80 $\mu$ L、90 $\mu$ L、100 $\mu$ L时,RSD值依次为2.61%、5.18%、4.29%;说明当加样量为80 $\mu$ L时,RSD值最小,所以选择80 $\mu$ L加样量。

#### [0036] 2.1.2反应时间的选择

[0037] 取200 $\mu$ L标准牛奶样,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后吸80 $\mu$ L加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,分别层析6min、8min和10min,用荧光免疫分析仪检测,记录 $F_1/F_0$ 的值见表2所示。

[0038] 从表2可以看出,层析时间为6min时,RSD值为3.30%,层析时间为8min时,RSD值为2.68%,层析时间为10min时,RSD值为3.05%;说明层析时间为8min时的RSD值小,所以选择层析8min。

## [0039] 2.2方法学验证

### [0040] 2.2.1曲线方程与范围

[0041] 分别取标准牛奶样200 $\mu$ L、1.3项下的10ng/mL的卡那霉素系列浓度标准溶液200 $\mu$ L、20ng/mL的卡那霉素系列浓度标准溶液200 $\mu$ L、30ng/mL的卡那霉素系列浓度标准溶液200 $\mu$ L、40ng/mL的卡那霉素系列浓度标准溶液200 $\mu$ L、60ng/mL的卡那霉素系列浓度标准溶液200 $\mu$ L,分别加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后各吸80 $\mu$ L分别加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,记录 $F_1/F_0$ ,见表3所示;以溶液中卡那霉素的浓度为横坐标,对应的 $F_1/F_0$ 为纵坐标,进行回归,得到卡那霉素标准曲线方程为 $y = -0.0002x^2 + 0.0198x + 0.2171$ ,卡那霉素标准曲线见图2所示;从表3和图2可以看出,卡那霉素在0.2319ng/mL至60ng/mL之间呈良好的相关性,相关系数为 $r = 0.9981$ 。取标准牛奶样200 $\mu$ L,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后吸80 $\mu$ L加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,记录 $F_1/F_0$ ,重复操作20次,计算20次的均值(M)和标准差(SD),以均值 $M + 2SD$ 计算检出限为0.2003ng/mL。

### [0042] 2.2.2精密度实验

[0043] 取10ng/mL、30ng/mL、40ng/mL三个浓度的卡那霉素系列浓度标准溶液,各取200 $\mu$ L,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后各吸80 $\mu$ L分别加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,记录 $F_1/F_0$ ,见表4所示;从表4可以看出,10ng/mL、30ng/mL、40ng/mL三个浓度的卡那霉素系列浓度标准溶液的 $F_1/F_0$ 值的RSD依次为1.35%、2.86%、2.03%,精密度的RSD小于5%,符合要求。

### [0044] 2.2.3加标回收率

[0045] 取3份标准牛奶样分别置EP管中,每份1mL,依次在3份标准牛奶样中加入卡那霉素

储备液20 $\mu$ L、30 $\mu$ L和40 $\mu$ L,依次配成低、中和高三个浓度,每个浓度平行3份,各取200 $\mu$ L,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后各吸80 $\mu$ L分别加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,记录各样本中卡那霉素的检测浓度,见表5所示;从表5可以看出,标准牛奶样中高、中、低卡那霉素测定的平均加标回收率分别为95.6%、102.5%和98.9%,RSD为4.16%,RSD小于5%,符合要求。

#### [0046] 2.2.4重复性试验

[0047] 取标准牛奶样995 $\mu$ L于EP管中,再加入卡那霉素储备液5 $\mu$ L,混匀,配成5ng/mL的样品;取200 $\mu$ L加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后吸80 $\mu$ L分别加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,记录样品中卡那霉素检测值的 $F_1/F_0$ ,见表6所示;从表6可以看出,卡那霉素重复性实验中, $F_1/F_0$ 测定值的RSD为1.72%,浓度测定值的RSD为0.85%,RSD小于5%。符合要求。

#### [0048] 2.2.5卡那霉素检测卡长期重复性实验

[0049] 取同一批次卡那霉素试纸条、标准牛奶样200 $\mu$ L和1.3项下的卡那霉素系列浓度标准溶液各200 $\mu$ L,分别加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后各吸80 $\mu$ L分别加入卡那霉素试纸条上的加样孔中,层析8min,用荧光免疫分析仪检测,每个月重复一次卡那霉素标准曲线,连续做5个月,卡那霉素长期重复性实验考查测定结果见表7所示;从表7可以看出,5个月内,标准牛奶样、卡那霉素系列浓度标准溶液10ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL和60ng/mL,对应的RSD为依次为0.31%、0.34%、0.26%、0.38%、0.42%和0.45%;RSD小于5%,符合要求。

#### [0050] 2.3二维码的制作

[0051] 以上经方法学验证,卡那霉素标准曲线方程符合要求,将获得的卡那霉素标准曲线方程和对应卡那霉素名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,贴在卡那霉素试纸条上,得到卡那霉素检测卡。

#### [0052] 2.4样品测定

[0053] 分别取供试品001、002和003各200 $\mu$ L至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取80 $\mu$ L滴加至卡那霉素检测卡上的加样孔内,室温下层析8min;层析后将卡那霉素检测卡插入荧光免疫分析仪的插卡口,点击测样,荧光免疫分析仪先扫描卡那霉素检测卡上的二维码,获得二维码中储存的卡那霉素标准曲线方程,再依次扫描卡那霉素检测卡上的T线和C线,获得样品 $F_1/F_0$ 的比值,荧光免疫分析仪中的Simple 1软件将 $F_1/F_0$ 的比值代入卡那霉素标准曲线方程进行计算,计算后显示屏将显示待检测样品名称和待检测样品的浓度。再分别取供试品004、005和006按国标(GB 29685-2013)进行测定;采用SPSS 17.0软件,对本发明和国标法测定后测定值作t检验分析;供试品中卡那霉素测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )见表8所示,从表8可以看出,t检验结果 $P>0.05$ ,说明采用本发明bFQICA法和国标法没有显著性差异。

[0054] 本发明应用的背景荧光猝灭-免疫层析法(Background fluorescence quenching immunochromatographic assay, bFQICA)主要包括卡那霉素检测卡和荧光免疫分析仪,本发明卡那霉素检测卡和荧光免疫分析仪的立体结构示意图见图3所示;荧光免疫分析仪安装有Simple 1软件系统。

[0055] 本发明基于背景荧光猝灭-免疫层析技术,建立检测牛奶中卡那霉素的方法学,本

发明将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器,制成卡那霉素二维码,然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处,得到卡那霉素检测卡;卡那霉素检测卡与荧光免疫分析仪配合使用,用于实际样品的快速测定,与国标法比较没有显著性差异。

### [0056] 3. 结论

[0057] 本发明基于背景荧光猝灭-免疫层析技术,通过实验建立了快速检测牛奶中卡那霉素的检测方法,本发明测定牛奶中卡那霉素的浓度范围为0.2003ng/mL至60ng/mL,最低检测限为0.2003ng/mL。

[0058] 本发明测定牛奶中的卡那霉素与国标方法(GB 22969-2008)测定牛奶中卡那霉素的方法相比,本发明是基于抗原、抗体的反应,所以专属性强;本发明中的硝酸纤维素膜上标记有背景荧光,胶体金猝灭剂与抗体结合,硝酸纤维素膜上的T线处固定有对应的抗原,当液体在试纸条上流动,T线处抗原-抗体-胶体金结合,引起T线处背景荧光猝灭,猝灭的程度用 $F_1/F_0$ 表示,进行定量分析,所以检测灵敏度高。用本发明测定牛奶中卡那霉素的检测限是0.2003 $\mu$ g/kg,国标方法(GB 22969-2008)中的液质联用测定牛奶中卡那霉素的检测限是10 $\mu$ g/kg;用本发明测定牛奶中的卡那霉素,不需要样品前处理,且在本研究将检测牛奶中卡那霉素标准曲线的信息,储存在二维码中,检测人员不用现场做标曲,使检测变的方便、快捷,每份样本仅需8min。而国标方法(GB 22969-2008)中的液质联用测定牛奶中卡那霉素不仅需要样品前处理,还需要检测人员现场做标曲,每份样本的平均检测需要50min;本方法与GICA方法相比较,GICA只能进行定性分析,适合大量样本的最初筛选,筛选出的样本还需要采用定量的方法再检测。而本方法,不仅可以根据T线处抗原-抗体-胶体金结合引起的颜色变化进行定性分析,还可进行定量分析。

[0059] 综上所述,本发明测定牛奶中卡那霉素的检测限为0.2003 $\mu$ g/kg,经实验选择的最优加样量为80 $\mu$ L,最优反应时间为8min;本发明灵敏度高、反应时间短、操作简便,可实现牛奶中卡那霉素的现场快速定量检测,使本发明广泛应用于食品安全领域奠定了基础。

[0060] 以上技术特征构成了本发明的实施例,其具有较强的适应性和实施效果,可根据实际需要增减非必要的技术特征,来满足不同情况的需求。

[0061] 表1不同加样量的选择

[0062]

样本编号	加样量 ( $\mu$ L)			
	60	80	90	100
1	因为加样量少,只层析到一半	0.2479	0.2249	0.2478
2		0.2358	0.2089	0.2305
3		0.2365	0.1991	0.2361
4		0.2447	0.2070	0.2527
5		0.2483	0.2374	0.2462
6		0.2296	0.2105	0.2370
RSD (%)	/	2.61	5.18	4.29

[0063] 表2不同反应时间的选择

[0064]

样本编号	反应时间 (min)		
	6	8	10
1	0.2364	0.2137	0.2070
2	0.2439	0.2209	0.2146
3	0.2602	0.2285	0.2135
4	0.2381	0.2142	0.2007
5	0.2539	0.2285	0.2241
6	0.2311	0.2109	0.1986
RSD (%)	3.30	2.68	3.05

[0065] 表3牛奶中卡那霉素检测 ( $F_1/F_0$ ) 标准曲线数据

[0066]

样本编号	卡那霉素标准溶液浓度 (ng/mL)					
	0.0	10.0	20.0	30.0	40.0	60.0
1	0.2135	0.4150	0.5746	0.6429	0.7250	0.7931
2	0.2191	0.4373	0.5834	0.6745	0.7142	0.7724
3	0.2072	0.4285	0.5638	0.6381	0.7233	0.7567
4	0.2276	0.4137	0.5305	0.6673	0.7317	0.7918
5	0.2149	0.4059	0.5832	0.6752	0.7185	0.7849
均值	0.2171	0.4218	0.5671	0.6581	0.7193	0.7816
SD	0.0067	0.0112	0.0196	0.0159	0.0061	0.0136
RSD (%)	3.17	2.65	3.41	2.43	0.82	1.79

[0067] 表4卡那霉素精密度试验

[0068]

样本编号	卡那霉素标准溶液浓度 (ng/mL)		
	10	20	30
1	0.4165	0.5674	0.6519
2	0.4239	0.5816	0.6326
3	0.4152	0.5329	0.6473
4	0.4086	0.5542	0.6245
5	0.4122	0.5631	0.6582
6	0.4201	0.5590	0.6348
RSD (%)	1.35	2.86	2.03

[0069] 表5牛奶中卡那霉素的加标回收率

[0070]

样本编号	卡那霉素			
	本底值 (ng)	加入量 (ng)	实测值 (ng)	回收率 (%)
低	0	10	10.02	100.2
	0	10	9.62	96.2
	0	10	10.03	100.3
中	0	20	21.73	108.7
	0	20	19.84	99.2
	0	20	19.93	99.7
高	0	30	28.56	95.2
	0	30	28.83	96.1
	0	30	29.62	95.4
RSD (%)	/	/	/	4.16

[0071] 表6重复性试验

[0072]

样本编号	卡那霉素检测值	
	$F_1/F_0$	含量 (ng/mL)
1	0.3184	5.0451
2	0.3196	5.0612
3	0.3212	5.0905
4	0.3096	5.0092
5	0.3127	5.0190
6	0.3243	5.1051
RSD (%)	1.72	0.85

[0073] 表7卡那霉素检测卡长期重复性实验考查测定结果

[0074]

卡那霉素 系列浓度 标准溶液 (ng/mL)	第一个月 ( $F_1/F_0$ )	第二个月 ( $F_1/F_0$ )	第三个月 ( $F_1/F_0$ )	第四个月 ( $F_1/F_0$ )	第五个月 ( $F_1/F_0$ )	RSD (%)
0	0.2185	0.2171	0.2052	0.2035	0.2149	0.31
10	0.4207	0.4218	0.4369	0.4280	0.4125	0.34
20	0.5524	0.5671	0.5571	0.5537	0.5591	0.26
30	0.6586	0.6581	0.6328	0.6471	0.6326	0.38
40	0.7134	0.7193	0.7205	0.7046	0.7134	0.42
60	0.7610	0.7816	0.7643	0.7632	0.7594	0.45

[0075] 表8牛奶供试品中卡那霉素测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

[0076]

样品编号	本发明 bFQICA	国标方法
	测定值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
001	95.3 $\pm$ 1.42	97.9 $\pm$ 2.19
002	55.7 $\pm$ 0.95	58.1 $\pm$ 3.04
003	48.5 $\pm$ 1.01	49.9 $\pm$ 2.62

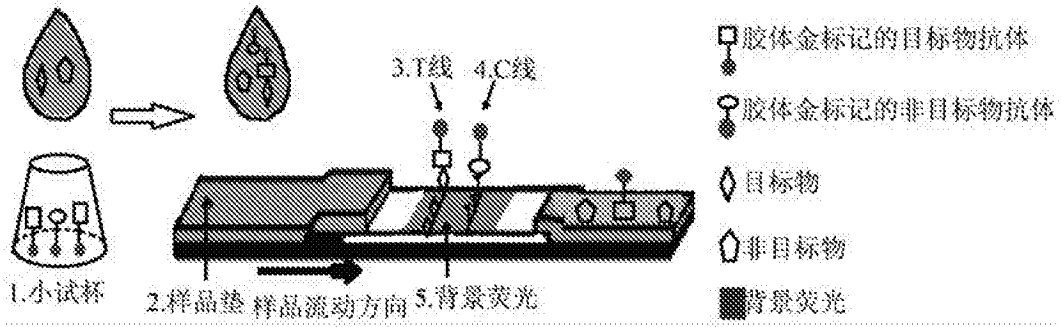


图1

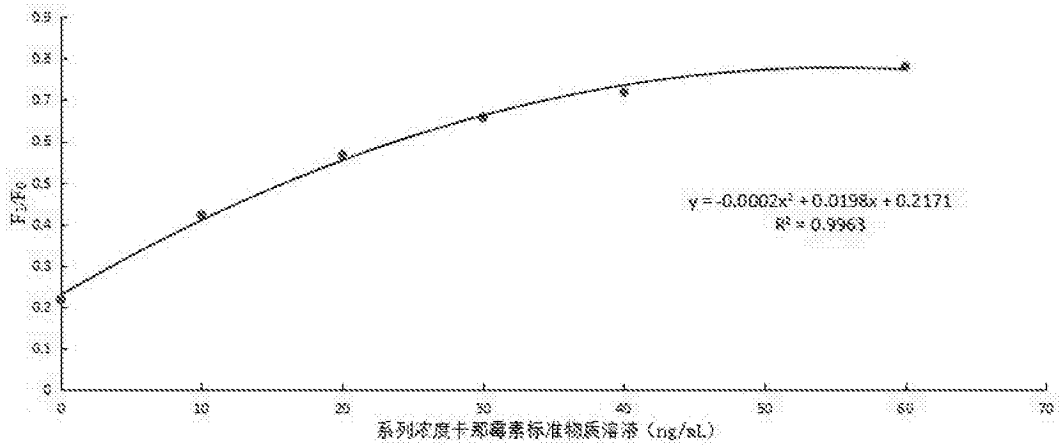


图2

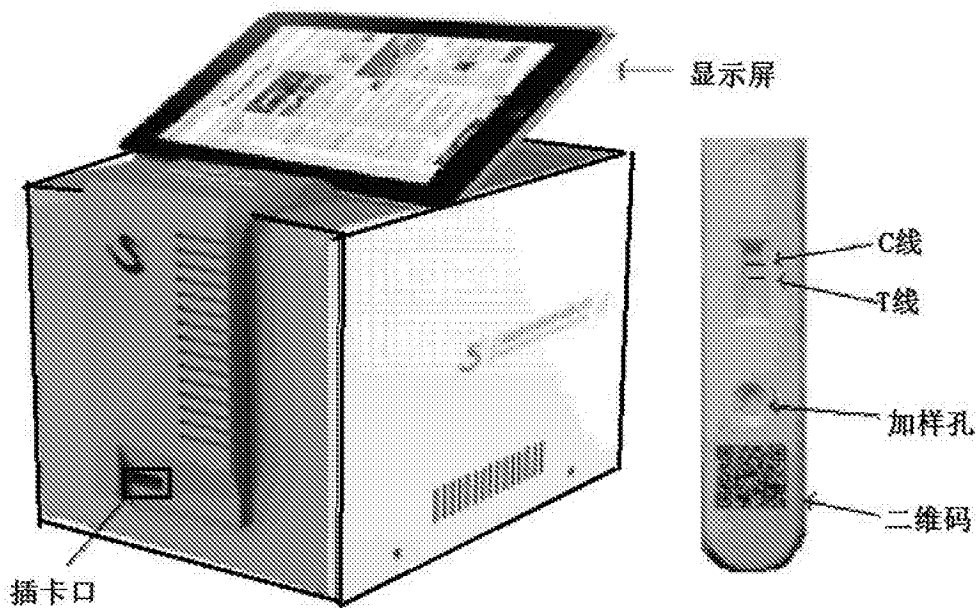


图3

专利名称(译)	基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN106885900A</a>	公开(公告)日	2017-06-23
申请号	CN201710250198.2	申请日	2017-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	新疆医科大学		
[标]发明人	李新霞 吴晓霞 王玉文 李久彤 张唯		
发明人	李新霞 吴晓霞 王玉文 李久彤 张唯		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/643 G01N33/558 G01N2021/6432		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及牛奶检测技术领域，是一种基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法；该基于背景荧光猝灭-免疫层析测定牛奶中卡那霉素的方法，按下述步骤进行：第一步，将卡那霉素标准曲线方程和名称输入二维码制码器，制成卡那霉素二维码，然后把卡那霉素二维码粘贴在卡那霉素试纸条上的二维码粘贴处，得到卡那霉素检测卡。本发明测定牛奶中卡那霉素的检测限为0.2003 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，经实验选择的最优加样量为80 $\mu\text{L}$ ，最优反应时间为8min；本发明灵敏度高、反应时间短、操作简便，可实现牛奶中卡那霉素的现场快速定量检测，使本发明广泛应用于食品安全领域奠定了基础。

