



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103134717 A

(43) 申请公布日 2013.06.05

(21) 申请号 201110388846.3

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2011.11.30

G01N 21/31 (2006.01)

(71) 申请人 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司

地址 011517 内蒙古自治区呼和浩特市和林格尔盛乐经济园区

(72) 发明人 刘志楠 喻东威 李梅 李海礁  
刘晓川 薛志清 杜丽 刘卫星

(74) 专利代理机构 北京汉德知识产权代理事务所(普通合伙) 11328

代理人 庄一方

(51) Int. Cl.

G01N 1/44 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

### (54) 发明名称

检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法及检测方法

### (57) 摘要

本发明提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法,包括:取待测的乳酸菌饮料,先于沸水浴中加热 30-90 秒,再于 2000g-4000g 离心 5-15 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后取上清液,并调节上清液的 pH 值至 6.7-7.0 得到待测液。该前处理方法可有效去除乳酸菌饮料中的干扰物质,尤其是细菌,使得处理后的乳酸菌饮料特别适用于雌二醇的试剂盒快速检测。本发明还提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的方法,根据上述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行处理后利用雌二醇酶联免疫检测试剂盒进行检测。该检测方法将成本较低的酶联免疫检测试剂盒运用于检测乳酸菌饮料,快速简便,准确性较高,检测方法的加标回收率为 83%-96%,检测结果的相对标准偏差为 2.6%-8.3%。

1. 一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法,其特征在于,包括:取待测的乳酸菌饮料,先于沸水浴中加热 30-90 秒,再于 2000g-4000g 的离心条件下离心 5-15 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并调节所述上清液的 pH 值至 6.7-7.0 得到待测液。

2. 如权利要求 1 所述的前处理方法,其中,所述离心的温度为 2-8℃。

3. 如权利要求 1 所述的前处理方法,其中,用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液对所述上清液的 pH 值进行所述调节。

4. 一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的方法,其特征在于,包括如下步骤:

根据权利要求 1 至 3 中任一权利要求所述的前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行处理,得到所述待测液;

利用雌二醇酶联免疫检测试剂盒对所述待测液中的雌二醇含量进行检测,得到所述待测液的雌二醇含量。

## 检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法及检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测雌二醇含量的前处理方法,尤其适用于乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测,本发明还提供了一种采用该前处理方法的检测方法。

### 背景技术

[0002] 食品中性激素残留污染问题已引起全世界的广泛关注。乳及乳制品营养丰富,但在动物饲养过程中存在滥用性激素(如雌二醇)的现象,导致乳类食品中性激素残留污染问题。对乳酸菌饮料中雌二醇含量进行检测,可有效控制乳酸菌饮料的质量,提高产品的安全性。

[0003] 目前,已可以通过酶联免疫吸附法快速检测乳酸菌饮料中雌二醇含量,其中前处理方法为:对待测的乳酸菌饮料进行离心处理,去除上层脂肪层后其余部分用于检测。采用这种前处理方法无法有效去除样本中的干扰物质,处理后的样本用雌二醇酶联免疫检测试剂盒检测时,其检测的准确性不理想。

[0004] 现有的雌二醇酶联免疫检测试剂盒常用于快速检测血液或尿液中的雌二醇,但是如果直接使用这种试剂盒检测乳酸菌饮料中的雌二醇,准确度不高,难以实现快速检测的目的。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法,能有效去除乳酸菌饮料中的干扰物质。

[0006] 本发明的另一个目的是提供一种乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测方法,通过特定的前处理方法去除乳酸菌饮料中的干扰物质,再用于酶联免疫检测试剂盒检测,提高检测的准确性。

[0007] 本发明提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法,包括取待测的乳酸菌饮料,先于沸水浴中加热 30-90 秒,再于 2000g-4000g 的离心条件下离心 5-15 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并调节上清液的 pH 值至 6.7-7.0 得到待测液。其中,离心的温度可以为 2-8℃。进行 pH 值调节时,可选用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液对上清液的 pH 值进行调节。

[0008] 本发明还提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的方法,包括如下步骤:根据上述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行处理,得到待测液;利用雌二醇酶联免疫检测试剂盒对待测液中的雌二醇含量进行检测,得到待测液的雌二醇含量。

[0009] 本发明的一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法,通过沸水浴加热、离心处理和 pH 调节,去除了乳酸菌饮料中的干扰物质,尤其可以一定程度上去除乳酸菌饮料中对检测结果有干扰的细菌。使用这种方法前处理后的乳酸菌饮料特别适用于使用试剂盒快速检测其中的雌二醇。

[0010] 本发明的一种乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测方法,通过上述方法对乳酸菌饮

料进行前处理后,再用酶联免疫检测试剂盒对其中的雌二醇含量进行检测,得到乳酸菌饮料中雌二醇的含量。该检测方法将成本较低的酶联免疫检测试剂盒运用于检测乳酸菌饮料,快速简便,准确性较高,测得的加标回收率为 83%–96%,检测结果的相对标准偏差为 2.6%–8.3%。

### 具体实施方式

[0011] 为了对发明的技术特征、目的和效果有更加清楚的理解,现结合各实施例说明本发明的具体实施方式。

[0012] 第一实施例:一种乳酸菌饮料的前处理方法。

[0013] 本实施例选用产品优益 C 作为待测的乳酸菌饮料。

[0014] 取待测的乳酸菌饮料于离心管中,先于沸水浴中加热 30 秒,再于 4℃ 的温度下、2000g 的离心条件下离心 8 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 6.7 得到待测液。

[0015] 第二实施例:一种乳酸菌饮料的前处理方法。

[0016] 本实施例选用产品养乐多作为待测的乳酸菌饮料。

[0017] 取待测的乳酸菌饮料于离心管中,先于沸水浴中加热 90 秒,再于 2℃ 的温度下、3000g 的离心条件下离心 5 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 7.0 得到待测液。

[0018] 第三实施例:一种乳酸菌饮料的前处理方法。

[0019] 本实施例选用产品喜乐作为待测的乳酸菌饮料。

[0020] 取待测的乳酸菌饮料于离心管中,先于沸水浴中加热 60 秒,再于 8℃ 的温度下、4000g 的离心条件下离心 15 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 6.8 得到待测液。

[0021] 第四实施例:一种乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测方法。

[0022] 1、试剂盒及酶标仪。

[0023] 雌二醇酶联免疫检测试剂盒:选用 Biostest 公司的 Estradiol Elisa kit 试剂盒,货号为 DC314006。

[0024] 酶标仪:选用 BioTek 公司的 Elx808 酶标仪。

[0025] 2、检测步骤。

[0026] 本实施例选用产品优益 C 作为待测的乳酸菌饮料。

[0027] 1) 按照第一实施例所述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行前处理,得到待测液。

[0028] 2) 取出微孔板,分别取 25  $\mu$  L 标准品(雌二醇含量分别为 0ng/L, 25ng/L, 100ng/L, 250ng/L, 500ng/L 和 1000ng/L) 和 25  $\mu$  L 待测液到各自的微孔中,每孔再加入 200  $\mu$  L 酶标记物,用手轻轻摇动混匀 60 秒,将微孔板于 20℃ 下避光孵育 2 小时。

[0029] 3) 将微孔内液体甩干,每孔加入 300  $\mu$  L 洗液,摇板 10 秒,弃掉洗液并将微孔板在吸水纸上拍干。

[0030] 4) 重复步骤 3) 3 次。

[0031] 5) 每孔加入 100  $\mu$  L 发色剂,用手轻轻摇动混匀 60 秒,再将微孔板于 20℃ 避光孵

育 15 分钟。

[0032] 6) 每孔加入 50  $\mu$ L 反应终止液,用手轻轻摇动混匀。5 分钟内在酶标仪 450nm 处测定每孔的吸光度值。

[0033] 7) 以标准品对应孔的吸光度值为纵坐标、标准品浓度为横坐标构建标准曲线,拟合方式为四参数逻辑拟合。将上清液对应孔的吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应的浓度,为待测液的雌二醇含量,即为乳酸菌饮料中雌二醇含量。

[0034] 3、检测方法的准确性验证。

[0035] 取待测的乳酸菌饮料,按下表所示雌二醇添加水平向其中加入不同量的雌二醇标准品(市购),得到加标乳酸菌饮料,用本实施例的检测方法对加标乳酸菌饮料进行三次平行检测,根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差,计算结果如下表所示。

[0036]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 1-1	50ng/L	87%	8.3%
加标乳酸菌饮料 1-2	100ng/L	93%	6.8%
加标乳酸菌饮料 1-3	200ng/L	96%	5.9%

[0037] 4、对比试验。

[0038] 操作步骤:取上述加标乳酸菌饮料,于 4 $^{\circ}$ C 的温度下、2000g 的离心条件下离心 8 分钟,去除上层漂浮的脂肪层后,取上清液,并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 6.7 得到对比待测液。按照本实施例检测步骤的步骤 2) 至 7) 中对待测液的检测方法对对比待测液进行检测,得到对比待测液的雌二醇含量。按上述方法平行检测三次,根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差,计算结果如下表所示。

[0039]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 1-1	50ng/L	35%	9.4%
加标乳酸菌饮料 1-2	100ng/L	46%	8.8%
加标乳酸菌饮料 1-3	200ng/L	50%	10.5%

[0040] 第五实施例:一种乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测方法。

[0041] 1、试剂盒及酶标仪。

[0042] 与第四实施例所述相同。

[0043] 2、检测步骤。

[0044] 本实施例选用产品养乐多作为待测的乳酸菌饮料。

[0045] 按照第二实施例所述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行前处理,得到待测液。其余步骤与第四实施例检测步骤的步骤 2) 至步骤 7) 所述相同。

[0046] 3、检测方法的准确性验证。

[0047] 取待测的乳酸菌饮料,按下表所示雌二醇添加水平向其中加入不同量的雌二醇标准品(市购),得到加标乳酸菌饮料,用本实施例的检测方法对加标乳酸菌饮料进行三次平行检测,根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差,计算结果如下表所示。

[0048]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 2-1	50ng/L	86%	7.2%
加标乳酸菌饮料 2-2	100ng/L	89%	3.1%
加标乳酸菌饮料 2-3	200ng/L	93%	6.9%

[0049] 4、对比试验。

[0050] 操作步骤：取上述加标乳酸菌饮料，于 2℃ 的温度下、3000g 的离心条件下离心 5 分钟，去除上层漂浮的脂肪层后，取上清液，并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 7.0 得到对比待测液。按照本实施例检测步骤的步骤 2) 至 7) 中对待测液的检测方法对对比待测液进行检测，得到对比待测液的雌二醇含量。按上述方法平行检测三次，根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差，计算结果如下表所示。

[0051]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 2-1	50ng/L	40%	12%
加标乳酸菌饮料 2-2	100ng/L	37%	10.2%
加标乳酸菌饮料 2-3	200ng/L	51%	8.7%

[0052] 第六实施例：一种乳酸菌饮料中雌二醇含量的检测方法。

[0053] 1、试剂盒及酶标仪。

[0054] 与第四实施例所述相同。

[0055] 2、检测步骤。

[0056] 本实施例选用产品喜乐作为待测的乳酸菌饮料。

[0057] 按照第三实施例所述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行前处理，得到待测液。其余步骤与第四实施例检测步骤的步骤 2) 至步骤 7) 所述相同。

[0058] 3、检测方法的准确性验证。

[0059] 取待测的乳酸菌饮料，按下表所示雌二醇添加水平向其中加入不同量的雌二醇标准品(市购)，得到加标乳酸菌饮料，用本实施例的检测方法对加标乳酸菌饮料进行三次平行检测，根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差，计算结果如下表所示。

[0060]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 3-1	50ng/L	90%	8.3%
加标乳酸菌饮料 3-2	100ng/L	83%	2.6%
加标乳酸菌饮料 3-3	200ng/L	89%	4.7%

[0061] 4、对比试验。

[0062] 操作步骤：取上述加标乳酸菌饮料，于 8℃ 的温度下、4000g 的离心条件下离心 15 分钟，去除上层漂浮的脂肪层后，取上清液，并用浓度为 1mol/L 的氢氧化钠溶液调节上清液的 pH 值至 6.8 得到对比待测液。按照本实施例检测步骤的步骤 2) 至 7) 中对待测液的检测方法对对比待测液进行检测，得到对比待测液的雌二醇含量。按上述方法平行检测三次，根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差，计算结果如下表所示。

[0063]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 3-1	50ng/L	45%	11.3%
加标乳酸菌饮料 3-2	100ng/L	33%	6.9%
加标乳酸菌饮料 3-3	200ng/L	53%	7.7%

[0064] 根据上述实施例的检测方法的准确性验证的实验结果可知,本发明检测方法的加标回收率为 83%–96%,检测结果的相对标准偏差为 2.6%–8.3%,回收率较高,相对标准偏差较低。参照上述实施例的对比试验,还可以发现本发明的加热步骤大大提高了检测结果的准确性,降低了检测结果的相对标准偏差。

[0065] 应当理解,虽然本说明书是按照各个实施例描述的,但并非每个实施例仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

[0066] 上文所列出的一系列详细说明仅仅是针对本发明的可行性实施例的具体说明,它们并非用以限制本发明的保护范围,凡未脱离本发明技艺精神所作的等效实施例或变更均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法及检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103134717A</a>	公开(公告)日	2013-06-05
申请号	CN201110388846.3	申请日	2011-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
[标]发明人	刘志楠 喻东威 李梅 李海礁 刘晓川 薛志清 杜丽 刘卫星		
发明人	刘志楠 喻东威 李梅 李海礁 刘晓川 薛志清 杜丽 刘卫星		
IPC分类号	G01N1/44 G01N33/53 G01N21/31		
其他公开文献	CN103134717B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

并刊小册1 26/11/110

本发明提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的前处理方法，包括：取待测的乳酸菌饮料，先于沸水浴中加热30-90秒，再于2000g-4000g离心5-15分钟，去除上层漂浮的脂肪层后取上清液，并调节上清液的pH值至6.7-7.0得到待测液。该前处理方法可有效去除乳酸菌饮料中的干扰物质，尤其是细菌，使得处理后的乳酸菌饮料特别适用于雌二醇的试剂盒快速检测。本发明还提供了一种检测乳酸菌饮料中雌二醇含量的方法，根据上述前处理方法对待测的乳酸菌饮料进行处理后利用雌二醇酶联免疫检测试剂盒进行检测。该检测方法将成本较低的酶联免疫检测试剂盒运用于检测乳酸菌饮料，快速简便，准确性较高，检测方法的加标回收率为83%-96%，检测结果的相对标准偏差为2.6%-8.3%。

[0036]

样本编号	雌二醇添加水平	平均回收率	检测结果的相对标准偏差
加标乳酸菌饮料 1-1	50ng/L	87%	8.3%
加标乳酸菌饮料 1-2	100ng/L	93%	6.8%
加标乳酸菌饮料 1-3	200ng/L	96%	5.9%

[0037] 4、对比试验。