



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109632674 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201910083444.9

(22)申请日 2019.01.29

(71)申请人 厦门鲨试剂生物科技股份有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧新阳工业
区新嘉路131号(厂房)

(72)发明人 吴海苹 吴尚毅 叶庆新 陈淑妹

(74)专利代理机构 厦门创象知识产权代理有限
公司 35232

代理人 王凤玲

(51) Int. Cl.

G01N 21/31(2006.01)

G01N 21/80(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种检测样品pH值的方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测样品pH值的方法,其包括将酸碱指示剂加入微孔板中;将已知不同pH值的pH标准溶液和待测样品各自加入含有所述酸碱指示剂的微孔板中,每孔加10~500 μ L,振板混匀,用仪器测各孔的OD值;以pH标准溶液的pH值为横坐标,其OD值为纵坐标,绘制标准曲线;计算待测样品的pH值;从而通过测试吸光度值的方法检测样品pH值,使得样品在检测时使用的样品量少,可批量检测、检测速度快、可准确定量,并且使用的仪器具有通用性,从而实现临床上白带pH值的批量快速测定,解决目前临床上白带pH值检测存在的问题。

1. 一种检测样品pH值的方法,其特征在于,包括:

(1) 将酸碱指示剂加入微孔板中;

(2) 将已知不同pH值的pH标准溶液和待测样品各自加入含有所述酸碱指示剂的微孔板中,每孔加10~500 μ L,振板混匀,用仪器测各孔的OD值;

(3) 以pH标准溶液的pH值为横坐标,pH标准溶液的OD值为纵坐标,绘制标准曲线;

(4) 计算待测样品的pH值。

2. 如权利要求1所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述步骤(1)中的酸碱指示剂由5~100 mL的无水乙醇与0~0.25 g的溴甲酚绿混合溶解,再用水定容至100 mL制成。

3. 如权利要求1所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于:所述步骤(4)中,是从所述标准曲线中查出待测样品的OD值相应的pH值,以便得到所述待测样品的pH值;或计算出所述标准曲线的回归方程式,再将待测样品的OD值代入所述回归方程式,计算出待测样品的pH值,以便得到所述待测样品的pH值。

4. 如权利要求1或2所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述步骤(1)在微孔板中每孔加入5~20 μ L的酸碱指示剂。

5. 如权利要求1所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述步骤(2)中用酶标仪在550~700nm的波长下,测各孔的OD值。

6. 如权利要求5所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述步骤(2)中在620nm或630nm的波长下,测各孔的OD值。

7. 如权利要求1所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述步骤(2)中采用已知不同pH值的柠檬酸-柠檬酸钠pH标准溶液。

8. 如权利要求7所述的一种检测样品pH值的方法,其特征在于,所述柠檬酸-柠檬酸钠pH标准溶液的pH值为3.8~5.8。

一种检测样品pH值的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及pH值测量领域,具体涉及一种检测样品pH值的方法。

背景技术

[0002] pH值的测量方法主要有指示剂法、电化学法及光学传感器法等;其中,pH试纸(卡)测量属于指示剂法,用pH试纸(卡)测试样品时,显色结果通常与标准色块不会完全一致,需要检验者在显色最为接近的两个不连续标准色块间估计一个数值,容易出现误差,使得pH试纸(卡)检测的精度低。而pH计是目前用以准确测量溶液pH值的仪器,主要是通过电极测量液体电位的物理量变化而测量pH值,但其只能用于单样品测试,所需样品量多,不可批量快速测定。

[0003] 因此,目前检测样品pH值的方法仍有待改进。

发明内容

[0004] 本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术中的技术问题之一。

[0005] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0006] 白带pH值测定是基本的阴道分泌物检查项目,正常白带pH值约为4.5,pH值大于5~6时,在排除干扰因素后通常表示患有滴虫性或细菌性阴道炎,因此白带的pH值测定可作为阴道炎症辅助诊断手段。传统的阴道分泌物pH值测定是用普通精密pH试纸接触分泌物,通过显色与标准色块对照读取pH值。然而临床应用常存以下问题:

[0007] 1、临床上白带取样通常是以棉拭子的方式送检,由于分泌物本身的半流体性状,加上棉球的吸水作用,棉拭子的湿润程度通常不能足够浸润pH试纸而使之充分显色,送检时间延长时尤为明显。

[0008] 2、有些厂家通过改进,缩小试纸面积做成测试卡,从专门的加样孔添加样品液体,从而减小检测所需的样品液量,但也减小了色块生成面积,从而影响视觉的判读。

[0009] 3、用pH试纸(卡)测试样品时,显色结果通常与标准色块不会完全一致,需要检验者在显色最为接近的两个不连续标准色块间估计一个数值,鉴于对pH值准确读数的要求,例如正常阴道pH值3.8~4.2与Amse1标准(细菌性阴道炎临床诊断的金标准)中的异常值(pH>4.5)接近,故对pH值测定的灵敏度和准确度要求都很高,但由于普通的精密试纸本身灵敏度以及人眼的色觉误差,造成实验误差通常在0.5个pH以上,常造成检测结果判定困难;

[0010] 4、目前有些厂家通过测试纸(卡)判读仪器进行辅助辨色判读结果,但常因试纸表面粗糙程度差别的干扰、试纸表面残留液体反光干扰、干湿纸卡读数差异较大等方面问题而影响结果判读的准确,而且结果为模拟数值,不是准确定量。此外,这些测试纸(卡)判读仪器通常只能配套专门的测试纸(卡)使用,不同厂家一般不通用,用户在更换测试纸(卡)厂家时必须重新购买仪器会造成浪费。

[0011] 5、pH计是目前常用以准确测量溶液pH值的仪器,其主要通过电极测量液体电位的

物理量变化而测量pH值,只能用于单样品测试,使用前需要校准且易受温度影响,而且还存在电极清洁、消毒方面的问题,不能用于白带之类微量样品pH值的批量快速测定。

[0012] 有鉴于此,发明人利用化学试剂使样品显色,再用仪器测量样品OD值的方法,以检测样品的pH值,该方法在检测时所需样品量少、可批量测量、检测速度快、可以准确定量测量且仪器通用性强。

[0013] 为此,本发明提出了一种检测样品pH值的方法,其包括:

[0014] (1) 将酸碱指示剂加入微孔板中;

[0015] (2) 将已知不同pH值的pH标准溶液和待测样品各自加入含有所述酸碱指示剂的微孔板中,每孔加10~500 μ L,振板混匀,用仪器测各孔的OD值;

[0016] (3) 以pH标准溶液的pH值为横坐标,pH标准溶液的OD值为纵坐标,绘制标准曲线;

[0017] (4) 计算待测样品的pH值。

[0018] 根据本发明的检测样品pH值的方法,通过测试pH标准溶液的吸光度值,绘制出pH标准溶液的标准曲线,再通过标准曲线和待测样品的吸光度值,得出待测样品的pH值,使得样品在检测时使用的样品量少,可批量检测、检测速度快、可准确定量,并且使用的仪器具有通用性,从而实现临床上白带pH值的批量快速测定,解决目前临床上白带pH值检测存在的问题。

[0019] 另外,根据本发明上述实施例提出的一种检测样品pH值的方法,还可以具有如下附加的技术特征:

[0020] 根据本发明实施例,所述步骤(1)中的酸碱指示剂由5~100mL的无水乙醇与0~0.25g的溴甲酚绿混合溶解,再用水定容至100mL制成。

[0021] 根据本发明实施例,所述步骤(4)中,是从所述标准曲线中查出待测样品的OD值相应的pH值,以便得到所述待测样品的pH值;或计算出所述标准曲线的回归方程式,再将待测样品的OD值代入所述回归方程式,计算出待测样品的pH值,以便得到所述待测样品的pH值。

[0022] 根据本发明实施例,所述步骤(1)在微孔板中每孔加入5~20 μ L的酸碱指示剂。

[0023] 根据本发明实施例,所述步骤(2)中用酶标仪在550~700nm的波长下,测各孔的OD值。

[0024] 根据本发明实施例,所述步骤(2)中在620nm或630nm的波长下,测各孔的OD值。

[0025] 根据本发明实施例,所述步骤(2)中采用已知不同pH值的柠檬酸-柠檬酸钠pH标准溶液。

[0026] 根据本发明实施例,所述柠檬酸-柠檬酸钠pH标准溶液的pH值为3.8~5.8。

[0027] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明:

[0028] 图1为本发明的pH标准溶液的标准曲线。

具体实施方式

[0029] 为了更好的理解上述技术方案,下面将更详细地描述本发明的示例性实施例,应当理解,可以以各种形式实现本发明而不应被这里阐述的实施例所限制。相反,提供这些实

实施例是为了能够更透彻地理解本发明,并且能够将本发明的范围完整的传达给本领域的技术人员。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0030] 需要说明的是,本发明所述酶标仪不是特指某一型号的仪器,而是泛指采用酶标仪分析原理进行分析测试的一类仪器,例如某些分光光度计、微量分光光度计、生化分析仪也常具备有酶标仪的分析功能,有些把酶标仪检测模块置入自动化仪器内,或在此基础上作些改进,例如做成工作站,也可以具有该检测功能,这些都属本发明所述的酶标仪这类仪器,在发明的保护范围内。适用这些仪器可节约用户仪器的购置成本。

[0031] 本发明所述的微量,是指相对可测量的样品液体积很少的范畴,而不是指某个具体的体积,通常仅需0.05-0.1mL待测液即可用于本测试,例如采用96半孔微孔板测试。操作者可以根据选用的微孔板类型来调整试剂或测试液的量来获得理想效果,而对于该类调整,仍属本发明的保护范围。

[0032] 本发明的酸碱指示剂的方案适用于pH在3.6-6.6间的样品,对于超过该pH范围的样品,可以通过更换合适的酸碱指示剂配套本发明的方法来实现测试,但该调整仍属本发明方法的保护范围。

[0033] 本发明所述快速检测,不是特指某个时间,具体取决于所选用测试仪器的读板速度,多数的酶标仪可在1分钟内完成,例如选用伯腾E1x808系列酶标仪。不同型号仪器的检测速度略有差别,但对于通过优化采用不同的仪器,来获得检测所需时间上的改进,仍属本发明的保护范围。

[0034] 本发明所述批量,不是特指某个数值,具体与操作者选用的微孔板型号和待测样的复孔数有关,以96孔板为例,若每个测试样的复孔数为2,则每次测试的批量可在四十个样品以上。而采用384等高通量的板及其配套仪器则可获得更高单次测试的批量,对于优化检测载体而提升批量,仍属本发明保护范围。

[0035] 实施例

[0036] 1、酸碱指示剂:参照以下表1配制(以100ml量为例):

[0037] 表1酸碱指示剂配制方案

[0038]

序号	原料	剂量	备注
A	无水乙醇	5~100ml	作为溶剂,优选体积20ml
B	溴甲酚绿	0~0.25g	以无水乙醇溶解均匀,优选0.05g
C	H ₂ O	0~95ml	把溶解后的混合物定容到100ml

[0039] 其中,上述A和B混合溶解时若有沉淀,可逐滴加入0.1M氢氧化钠0~10ml溶解,再加水定溶到100ml。A和B溶解后的液体颜色应为蓝绿(略偏蓝)色,若有较大色差,可逐滴加入0.1M氢氧化钠调整溶液颜色,符合时停止加入。

[0040] 使用该酸碱指示剂剂的pH值线性工作范围:3.6-6.6。

[0041] 2、pH标准溶液:

[0042] 本实施例中可配制pH标准溶液,也可直接选购相应pH值的标准溶液。其中,配制pH标准溶液时:

[0043] 配制0.1mol/L柠檬酸溶液:取柠檬酸($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$:分子量210.14) 21.01g溶解于950mL纯水,溶解均匀后定容到1L,以便获得0.1mol/L柠檬酸溶液。

[0044] 配制0.1mol/L柠檬酸钠溶液:取柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$:分子量294.12) 29.41g溶解于950mL纯水,溶解均匀后定容到1L,以便获得0.1mol/L柠檬酸钠溶液。

[0045] 依下表2方案配制(柠檬酸-柠檬酸钠)pH标准溶液:

[0046] 表2柠檬酸-柠檬酸钠pH标准溶液配制

	PH 值	0.1M 柠檬酸 (ml)	0.1M 柠檬酸钠 (ml)
	3.8	14	6
	4.2	12.3	7.7
[0047]	4.6	10.3	9.7
	5.0	8.2	11.8
	5.4	6.4	13.6
[0048]	5.8	4.7	15.3

[0049] 3、采用酶标仪检测临床上白带样品pH值的方法:(以150 μ L半孔96微孔板为例)

[0050] (1) 将上述配制的酸碱指示剂分装于微孔板中,每孔加5~20 μ L,优选地,每孔加10 μ L。

[0051] (2) 取已加入10 μ L酸碱指示剂的96半孔微孔板,分别加入上述六个pH值的pH标准溶液或待测样品,每孔加10~500 μ L,优选地,每孔加100 μ L;其中pH标准溶液各3个复孔,待测样品各2个或3个复孔;加样完成后振板混匀,用伯腾808型酶标仪测OD₆₃₀值。经测试,各pH标准液的OD₆₃₀如下表3所示。

[0052] 表3pH标准溶液的OD₆₃₀

[0053]

序号	标准 PH 值	孔位	OD ₆₃₀	平均 OD	SD	CV (%)
STD1	3.8	A1	0.160	0.159	0.003	0.065
		A2	0.157			
		A3	0.160			
STD2	4.2	B1	0.298	0.293	0.016	0.396
		B2	0.299			
		B3	0.281			
STD3	4.6	C1	0.550	0.551	0.006	0.134
		C2	0.548			
		C3	0.556			
STD4	5	D1	0.918	0.903	0.021	0.405
		D2	0.900			
		D3	0.892			
STD5	5.4	E1	1.119	1.159	0.060	1.096
		E2	1.194			
		E3	1.165			
STD6	5.8	F1	1.393	1.358	0.049	0.856
		F2	1.331			
		F3	1.351			

[0054] (3) 以 pH 标准溶液的 pH 值为横坐标, 其 OD₆₃₀ 值为纵坐标, 绘制标准曲线; 获得的标准曲线如图 1 所示, 经计算获得的回归方程如表 4 所示。

[0055] 表 4 pH 标准曲线公式

[0056]

曲线公式	A	B	R 值
$Y=A \times X+B$	0.639	-2.33	0.9939

[0057] (4) 计算待测样品的 pH 值。选择加入的 36 个临床样品, 其中各类阴道炎患者 (病患组) 12 例, 健康者 (正常对照组) 24 例。经计算正常对照组与病患组阴道分泌物测定结果分类统计如以下表 5。

[0058] 表 5 阴道炎患者与健康者阴道分泌物 pH 结果

[0059]

组别	数量	年龄	pH 值
病患组	6	40.0±8.7	5.41±0.42
正常对照组	30	28.6±6.4	4.18±0.47

[0060] 从检测的结果看, 本方案检测 pH 值在 3.8-5.8 的范围线性良好, 可满足临床白带正

常检测需要,病患组和正常对照组测定结果符合临床预期。

[0061] 由此,相对现有的样品pH值的测量,根据本发明的检测样品pH值的方法,在检测时使用的样品量少,可批量检测、检测速度快、可准确定量,并且使用的仪器具有通用性,可实现临床上白带pH值的批量快速测定,解决目前临床上白带pH值检测存在的问题。

[0062] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不应理解为必须针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例进行接合和组合。

[0063] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

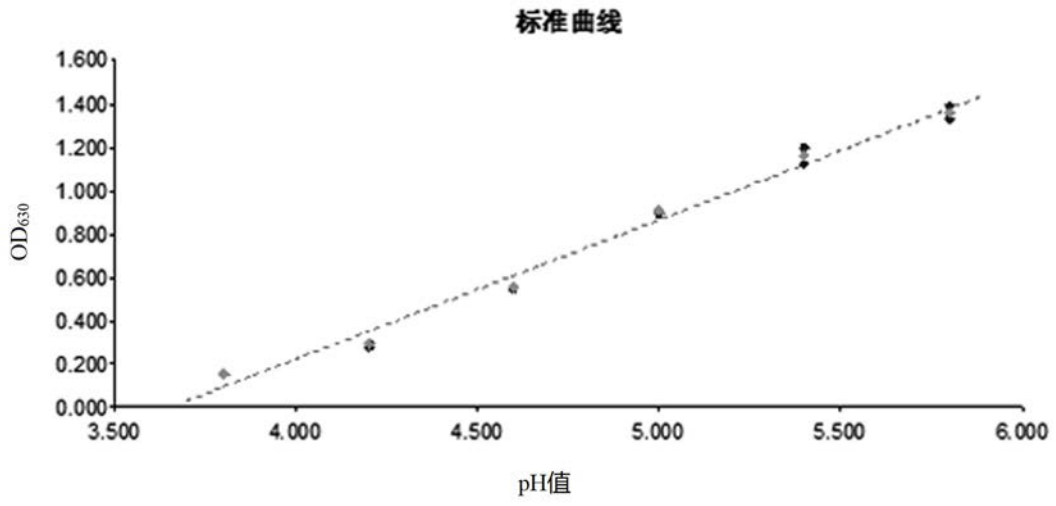


图1