



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1695—2020

人类辅助生殖技术用医疗器械 培养用液中氨基酸检测方法

Medical devices for human assisted reproductive technology—
Determination of amino acids in human assisted reproductive media

2020-03-31 发布

2021-04-01 实施

国家药品监督管理局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准由中国食品药品检定研究院归口。

本标准起草单位：中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：柯林楠、黄元礼、赵丹妹、方玉、韩倩倩、王春仁、段晓杰。

人类辅助生殖技术用医疗器械 培养液中氨基酸检测方法

1 范围

本标准规定了用氨基酸分析法、高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪法、高效液相色谱柱前衍生法检测人类辅助生殖技术用培养液中氨基酸成分。

本标准适用于人类辅助生殖技术用培养液中所含甘氨酸(GLY)、亮氨酸(LEU)、蛋氨酸(MET)、酪氨酸(TYR)、组氨酸(HIS)、苏氨酸(THR)、丙氨酸(ALA)、异亮氨酸(ILE)、色氨酸(TRY)、胱氨酸(CYS)、赖氨酸(LYS)、天门冬氨酸(ASP)、缬氨酸(VAL)、苯丙氨酸(PHE)、脯氨酸(PRO)、丝氨酸(SER)、谷氨酸(GLU)、精氨酸(ARG)、牛磺酸(TAU)19种氨基酸的定量分析。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

JJG 1064—2011 氨基酸分析仪检定规程

YY/T 0995 人类辅助生殖技术用医疗器械 术语和定义

3 术语和定义

YY/T 0995 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

氨基酸分析法 amino acid analyzer

氨基酸分析仪中离子交换色谱柱将样品中不同的氨基酸分离,并以茚三酮做柱后衍生后,在570 nm和440 nm波长下测定,以外标法进行定量。

3.2

高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪法 high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry

高效液相色谱将样品中的待测成分初步分离开,三重四级杆质谱仪对分开的待测成分通过筛选母离子质核比得到待测离子,待测离子经碰撞后碎裂成子离子,最后通过子离子的碎片强度定量待测成分。

3.3

高效液相色谱柱前衍生法 high-performance liquid chromatography pre-column derivatization and analysis method

待测组分先通过衍生化反应,转化为衍生化产物,然后经过色谱柱与样品中的其他组分分离,再通过外标法进行定量。

4 方法一：氨基酸分析仪法(仲裁法)

4.1 原理

不同氨基酸有不同的色谱表现,通过氨基酸分析仪的离子交换色谱柱分离后,以茚三酮做柱后衍生后进行测定,以外标法定量。

注:氨基酸分析仪法测定含有二肽,如丙氨酰-谷氨酰胺等培养用液时,胱氨酸(CYS)定量会受到培养用液中二肽的干扰,不适宜采用该法。

4.2 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

4.2.1 不同 pH 和离子强度的洗脱用柠檬酸锂缓冲液:按仪器使用说明书配制或购买。

4.2.2 茚三酮溶液:按仪器使用说明书配制或购买。

4.2.3 4%磺基水杨酸溶液:称取磺基水杨酸 4 g,加水稀释至 100 mL。

4.2.4 0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 9 mL,加水适量使成 1 000 mL,摇匀。

4.2.5 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4 g 氢氧化钠,加新沸过的冷水使成 1 000 mL,摇匀。

4.2.6 19 种氨基酸对照品:国家(或国际)标准品或可量值溯源的对照品。

4.3 对照品溶液配制

4.3.1 氨基酸对照品储备液

分别取氨基酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至刻度,制成氨基酸对照品储备液。称取 L-色氨酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加少许水和数滴 0.1 mol/L 氢氧化钠,使之溶解,加水定容至刻度。

4.3.2 混合氨基酸对照品系列溶液

吸取单个氨基酸对照品储备液适量,置于同一容量瓶中,加水稀释配制成混合氨基酸对照品储备液。将混合氨基酸对照品储备液稀释,配制成混合氨基酸对照品系列溶液,使各氨基酸浓度在 1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存一周。

4.4 仪器

4.4.1 电子天平,精度为 0.000 1 g。

4.4.2 氨基酸分析仪。

4.4.3 高速离心机。

4.4.4 涡旋振荡器。

4.5 试样制备

精密移取一定量样品,加水稀释至各氨基酸浓度在 1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围。

样品中如含有蛋白质,取样品 0.5 mL,加 0.5 mL 4%磺基水杨酸,混匀后,9 500 g 离心 10 min,取上清液备用。若上清液中各氨基酸浓度不在 1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围,应用水将浓度稀释至该范围。

4.6 分析步骤

4.6.1 仪器调试

使用混合氨基酸对照品系列溶液注入氨基酸分析仪,参照 JJG 1064—2011《氨基酸分析仪检定规

程》及仪器说明书,适当调整仪器操作程序及参数和洗脱用缓冲溶液试剂配比,确认仪器操作条件。

4.6.2 测试

在上述测试条件下,取混合氨基酸对照品系列溶液和样品溶液(或供试液)20 μL ,分别注入氨基酸分析仪,以各氨基酸对照品峰面积为纵坐标,氨基酸对照品浓度为横坐标,绘制各氨基酸标准曲线,计算回归方程。

4.7 结果计算与表示

4.7.1 样品中各氨基酸含量

样品中各氨基酸含量按式(1)计算:

$$X_i = C_i \times K \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_i ——样品中氨基酸 i 含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

C_i ——根据回归方程计算样品测定液中氨基酸 i 含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

K ——试样稀释倍数。

4.7.2 结果表示

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果。

4.8 质量控制

4.8.1 分离度

各氨基酸分离度 $\geq 85\%$ 。

4.8.2 空白分析

每次分析至少做一个实验室空白,实验室空白中检出每个目标化合物的浓度不得超过方法的检出限。

4.8.3 校准

每批样品应绘制标准曲线,相关系数应 ≥ 0.995 ,否则应重新绘制标准曲线。

每20个样品或每批次样品(少于20个样品)应测定一个标准曲线中间浓度点标准溶液,其测定结果与该点浓度的相对偏差应 $\leq 15\%$,否则应重新绘制标准曲线。

4.8.4 平行样测试

每个样品需做平行双样,平行双样测定结果的相对偏差应 $\leq 15\%$ 。

5 方法二:高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪法

5.1 原理

通过乙腈沉淀人类辅助生殖技术用培养用液中的蛋白质,离心取得上清液后,通过高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪分离检测,根据保留时间及特征离子质核比定性,外标法定量。

5.2 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

5.2.1 乙腈,色谱纯。

5.2.2 甲酸,色谱纯。

5.2.3 0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸 9 mL,加水适量使成 1 000 mL,摇匀。

5.2.4 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 4 g 氢氧化钠,加新沸过的冷水使成 1 000 mL,摇匀。

5.2.5 19 种氨基酸对照品:国家(或国际)标准品或可量值溯源的对照品。

5.3 氨基酸对照品溶液配制

5.3.1 氨基酸对照品储备液

分别取氨基酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至刻度,制成氨基酸对照品储备液。称取 L-色氨酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加少许水和数滴 0.1 mol/L 氢氧化钠,使之溶解,加水定容至刻度。

5.3.2 混合氨基酸对照品系列溶液

移取单个氨基酸对照品储备液适量,置于同一容量瓶中,加空白溶液(与待测样品基质相同,但不含氨基酸及蛋白)稀释配制成混合氨基酸对照品储备液。将混合氨基酸对照品储备液空白溶液稀释,配制成混合氨基酸对照品系列溶液,使各氨基酸浓度在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~1 $\mu\text{g/mL}$ 范围。

5.4 仪器

5.4.1 高效液相色谱串联三重四级杆质谱仪,配电喷雾离子化源(ESI)。

5.4.2 电子天平,精度为 0.000 1 g。

5.4.3 高速离心机。

5.4.4 涡旋振荡器。

5.5 试样制备

精密移取一定量样品,加水稀释至各氨基酸浓度在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~1 $\mu\text{g/mL}$ 范围。

样品中如含有蛋白质,取样品 100 μL ,加 200 μL 乙腈,涡旋混匀后,9 500 g 离心 10 min,取上清液备用。若上清液中各氨基酸浓度不在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~1 $\mu\text{g/mL}$ 范围,应用水将浓度稀释至该范围。

5.6 分析步骤

5.6.1 仪器参考条件

5.6.1.1 高效液相色谱仪参考条件

高效液相色谱仪参考条件如下:

- 色谱柱:填料为 3 μm 五氟苯基柱,柱长 150 mm、内径 2.1 mm 的色谱柱或其他性能相似的色谱柱。
- 流动相:A 为 100% 水(含 0.1% 甲酸溶液);B 为 100% 乙腈(含 0.1% 甲酸溶液)。
- 流速:0.35 mL/min。
- 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 进样量:1.0 μL 。

f) 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序^a

时间/min	流动相 B 比例/%
1.4	0
3.5	25
7.5	35
8.0	95
11.0	95
11.5	0
14.0	停止

^a 对不同色谱柱及液相,洗脱程序可能存在差异,测定前宜将程序优化到最佳。

5.6.1.2 质谱仪参考条件

质谱仪参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源;
- b) 离子检测方式:多反应监测;
- c) 离子源接口电压:−3.0 kV;
- d) 雾化气:氮气,3.0 L/min;
- e) 干燥气:氮气,10 L/min;
- f) 加热气:空气,10 L/min;
- g) 碰撞气:氦气;
- h) 脱溶剂管温度:250 ℃;
- i) 加热模块温度:400 ℃;
- j) 接口温度:300 ℃。

19 种氨基酸的质谱分析条件参数见表 2。

表 2 19 种氨基酸的质谱分析参数^a

氨基酸名称	定量离子/(<i>m/z</i>)	离子极性	Q1 Prerod bias/V	CE/V	Q3 Prerod bias/V
甘氨酸 (GLY)	75.90>30.15	正离子	−17.0	−11.0	−30.0
丙氨酸 (ALA)	89.90>44.10	正离子	−22.0	−12.0	−18.0
脯氨酸 (PRO)	116.0>70.15	正离子	−30.0	−18.0	−14.0
丝氨酸 (SER)	105.90>60.10	正离子	−25.0	−12.0	−11.0
缬氨酸 (VAL)	118.00>57.10	正离子	−12.0	−30.0	−23.0

表 2 (续)

氨基酸名称	定量离子/ (m/z)	离子极性	Q1 Prerod bias/V	CE/V	Q3 Prerod bias/V
苏氨酸 (THR)	120.10>74.15	正离子	-27.0	-13.0	-14.0
亮氨酸 (LEU)	132.10>30.05	正离子	-30.0	-18.0	-29.0
异亮氨酸 (ILE)	132.10>69.15	正离子	-30.0	-19.0	-14.0
天冬氨酸 (ASP)	134.00>74.05	正离子	-30.0	-15.0	-14.0
赖氨酸 (LYS)	147.20>130.10	正离子	-15.0	-16.0	-25.0
谷氨酸 (GLU)	147.90>84.10	正离子	-11.0	-17.0	-17.0
甲硫氨酸 (MET)	149.90>56.10	正离子	-11.0	-18.0	-11.0
组氨酸 (HIS)	155.90>110.10	正离子	-18.0	-15.0	-23.0
苯丙氨酸 (PHE)	166.10>103.10	正离子	-12.0	-29.0	-20.0
精氨酸 (ARG)	175.20>60.10	正离子	-19.0	-16.0	-24.0
酪氨酸 (TYR)	182.10>136.10	正离子	-14.0	-15.0	-27.0
胱氨酸 (CYS)	241.00>73.90	正离子	-19.0	-29.0	-15.0
色氨酸 (TRY)	205.10>188.15	正离子	-16.0	-12.0	-23.0
牛磺酸 (TAU)	124.15>79.90	负离子	15.0	22.0	16.0
* 对不同质谱仪,参数可能存在差异,测定前宜将质谱参数优化到最佳。					

5.6.1.3 仪器调谐

按照仪器使用说明书在规定时间和频次内对高效液相色谱串联质谱仪进行仪器质量数和分辨率校正,其中仪器质量数偏移在 ± 0.5 Da 之内,质谱峰半峰宽在 0.6 Da~0.9 Da,以确保仪器处于最佳测试状态。

注: Da,道尔顿(Dalton)的缩写,指以人名命名的原子质量单位。

5.6.2 测试

在上述测试条件下,取混合氨基酸对照品系列溶液和样品溶液(或供试液)1 μ L,分别注入仪器,以

各氨基酸对照品峰面积为纵坐标,氨基酸对照品浓度为横坐标,绘制各氨基酸标准曲线,计算回归方程。

5.7 结果计算与表示

5.7.1 样品中各氨基酸含量

样品中各氨基酸含量按式(2)计算:

$$X_i = C_i \times K \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X_i ——样品中各氨基酸 i 含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

C_i ——根据回归方程计算样品测定液中氨基酸 i 含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

K ——试样稀释倍数。

5.7.2 结果表示

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果。

5.8 质量控制

5.8.1 灵敏度

各氨基酸信噪比应大于 10。

5.8.2 空白分析

每次分析至少做一个实验室空白,实验室空白中检出每个目标化合物的浓度不得超过方法的检出限。

5.8.3 校准

每批样品应绘制标准曲线,相关系数应 ≥ 0.995 ,否则应重新绘制标准曲线。

每 20 个样品或每批次样品(少于 20 个样品)应测定一个标准曲线中间浓度点标准溶液,其测定结果与该点浓度的相对偏差应 $\leq 20\%$,否则应重新绘制标准曲线。

5.8.4 平行样测试

每个样品需做平行双样,平行双样测定结果的相对偏差应 $\leq 20\%$ 。

6 方法三:高效液相色谱柱前衍生法

6.1 原理

一级氨基酸,在巯基试剂存在下,首先与邻苯二醛(OPA)反应,生成 OPA-氨基酸;反应完毕后,加入 9-芴甲基氯甲酸甲酯(FMOC),剩余的二级氨基酸与 FMOC 继续反应,生成 FMOC-氨基酸,两次反应生成的氨基酸衍生物经反相高效液相色谱分离后用紫外检测器(或荧光检测器)检测,在一定范围内其吸光值与氨基酸浓度成正比。

注:本方法可使用市售在线衍生试剂盒,通过高效液相色谱进行测试。

6.2 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

6.2.1 流动相 A:称取十二水合磷酸氢二钠 9.0 g,十水合四硼酸钠 9.5 g,加水 2 000 mL,用盐酸

调pH至8.2。

6.2.2 流动相B:取甲醇450 mL,乙腈450 mL,水100 mL,混匀。

6.2.3 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 10.2):取硼酸24.73 g,加水800 mL溶解,用40%氢氧化钠溶液调pH至10.2,然后加水稀释至1 000 mL。

6.2.4 邻苯二甲醛溶液:取邻苯二甲醛80 mg,乙酰半胱氨酸97 mg,加0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 10.2)7 mL,加乙腈1 mL溶解。

6.2.5 茚代甲氧基酰氯溶液:取茚代甲氧基酰氯40 mg,加乙腈8 mL溶解。

6.2.6 稀释液:取流动相A 100 mL,加磷酸0.5 mL,混匀。

6.2.7 0.1 mol/L 盐酸溶液:取盐酸9 mL,加水适量使成1 000 mL,摇匀。

6.2.8 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取4 g 氢氧化钠,加新沸过的冷水使成1 000 mL,摇匀。

6.2.9 19种氨基酸对照品:国家(或国际)标准品或可量值溯源的对照品。

6.3 氨基酸对照品溶液配制

6.3.1 氨基酸对照品储备液

分别取氨基酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并定容至刻度,制成氨基酸对照品储备液。称取L-色氨酸对照品适量至容量瓶中,精密称定,加少许水和数滴0.1 mol/L 氢氧化钠,使之溶解,加水定容至刻度。

6.3.2 混合氨基酸对照品系列溶液

移取单个氨基酸对照品储备液适量,置于同一容量瓶中,加水稀释配制成混合氨基酸对照品储备液。将混合氨基酸对照品储备液稀释,配制成混合氨基酸对照品系列溶液,使各氨基酸浓度在1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围。

6.4 仪器

6.4.1 电子天平,精度为0.000 1 g。

6.4.2 高效液相色谱仪。

6.4.3 高速离心机。

6.4.4 涡旋振荡器。

6.5 试样制备

精密移取一定量样品,加水稀释至各氨基酸浓度在1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围。

样品中如含有蛋白质,取样品1 mL,加1 mL 4%磺基水杨酸,混匀后,9 500 g 离心10 min,取上清液作为待测液备用。若上清液中各氨基酸浓度不在1 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围,应用水将浓度稀释至该范围。

6.6 分析步骤

6.6.1 高效液相色谱仪参考条件

6.6.1.1 色谱柱:填料为粒径3 μm 十八烷基硅烷键合硅胶,柱长为15 cm、柱内径为4.6 mm 的色谱柱。

6.6.1.2 柱温:50 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.6.1.3 检测波长:338 nm(一级氨基酸),262 nm(二级氨基酸)[如使用荧光检测器检测,激发波长340 nm,发射波长450 nm(一级氨基酸);激发波长266 nm,发射波长305 nm(二级氨基酸)]。

6.6.1.4 梯度洗脱条件:见表3。

表 3 流动相梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%	流速/(mL/min)
0	95	5	1.6
6	90	10	1.6
8	90	10	1.6
10	84	16	1.3
23	58	42	1.0
24	57	43	1.6
30	50	50	1.6
31	0	100	1.6
34	0	100	1.6
35	95	5	1.6
40	95	5	1.6

注：由于各实验室 HPLC 仪器管路内径、长度及流通池体积大小的差异，提供的梯度洗脱条件仅供参考，请根据仪器实际情况调整梯度洗脱条件。

6.6.2 测定

精密量取对照品溶液 50 μL ，置于 5 mL 塑料离心管中，精密加入 0.4 mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 10.2) 250 μL ，混匀，精密加邻苯二甲醛溶液 50 μL ，混匀，放置 30 s，精密加入茚代甲氧基酰氯溶液 50 μL ，混匀，放置 30 s，精密加稀释剂 1.6 mL，精密量取 40 μL ，注入液相色谱仪，记录色谱图；另精密量取供试品溶液 40 μL 同法处理后测定。

6.7 结果计算与表示

6.7.1 样品中各氨基酸含量

样品中各氨基酸含量按式(3)计算：

$$X_i = C_i \times K \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X_i ——样品中各氨基酸 i 含量，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

C_i ——根据回归方程计算样品测定液中氨基酸 i 含量，单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

K ——试样稀释倍数。

6.7.2 结果表示

以两个平行试样测定结果的算术平均值报告结果。

6.8 质量控制

6.8.1 分离度

各氨基酸间的分离度均大于 1.5。

6.8.2 空白分析

每次分析至少做一个实验室空白,实验室空白中检出每个目标化合物的浓度不得超过方法的检出限。

6.8.3 校准

每批样品应绘制标准曲线,相关系数应 ≥ 0.995 ,否则应重新绘制标准曲线。

每 20 个样品或每批次样品(少于 20 个样品)应测定一个标准曲线中间浓度点标准溶液,其测定结果与该点浓度的相对偏差应 $\leq 20\%$,否则应重新绘制标准曲线。

6.8.4 平行样测试

每个样品需做平行双样,平行双样测定结果的相对偏差应 $\leq 20\%$ 。
