

1936

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1852—2022

人类辅助生殖技术用医疗器械 培养用液中铵离子的测定

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

2022-08-17 发布

2023-09-01 实施



国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法一：离子色谱法(仲裁法).....	1
5 方法二：酶法.....	5

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

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专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由中国食品药品检定研究院归口。

本文件起草单位：中国食品药品检定研究院、吉林省医疗器械检验研究院、中科谱研(北京)科技有限公司、长春汇力生物技术有限公司。

本文件主要起草人：柯林楠、蔡爱华、梁立娜、李仁勇、黄元礼、毛歆、韩倩倩、于雅鑫、王菁菁、曲守方。

人类辅助生殖技术用医疗器械 培养用液中铵离子的测定

1 范围

本文件规定了用离子色谱法和酶法测定人类辅助生殖技术用培养用液中铵离子(NH_4^+)含量的方法。

本文件适用于含氨基酸和/或蛋白质的人类辅助生殖技术用培养用液中铵离子的含量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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

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

铵含量 ammonium content

人类辅助生殖技术用培养用液中氨基酸和/或蛋白质降解出的氨(在培养用液中以铵离子形式存在)的质量浓度(以 NH_4^+ 计)或浓度(以 NH_4^+ 计)。

4 方法一:离子色谱法(仲裁法)

4.1 原理

通过超滤离心法去除人类辅助生殖技术用培养用液中的蛋白质,取分离出的液体,用离子色谱仪分离测定铵离子含量。供试液在高压输液泵的作用下由淋洗液带入装有填充剂的色谱柱,铵离子与其他阳离子分离后,利用电导检测器进行测定,根据标准溶液中铵离子出峰的保留时间定性,标准曲线法定量计算样品中的铵含量。

4.2 试剂和材料

本方法所用水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 甲烷磺酸:优级纯, $\rho=1.4810\text{ g/mL}$ 。

4.2.2 硝酸:优级纯,65%。

4.2.3 硫酸铵:优级纯。

4.2.4 氯化钠:分析纯。

4.2.5 超滤离心管:30 K。

4.3 溶液配制

4.3.1 铵离子对照品贮备液,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

精密称取硫酸铵(4.2.3)0.367 1 g,置于100 mL量瓶中,加适量水使硫酸铵溶解并稀释至刻度,摇匀。用塑料瓶贮存。该溶液可在避光、4 $^{\circ}\text{C}$ 存放一个月。也可以直接购买有证标准物质。

4.3.2 铵离子对照品中间液,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

精密量取铵离子对照品贮备液(4.3.1)1 mL,置于100 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。

4.3.3 铵离子对照品系列溶液

精密量取铵离子对照品中间液(4.3.2)30 μL 、150 μL 、300 μL 、600 μL 、1 000 μL ,置于10 mL量瓶中,用水稀释至刻度,使铵离子质量浓度在0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内。

4.3.4 甲烷磺酸淋洗贮备液,1.00 mol/L

精密量取甲烷磺酸(4.2.1)32.50 mL,置于500 mL量瓶中,加适量水使甲烷磺酸溶解并稀释至刻度,摇匀。贮存于聚丙烯塑料瓶中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.3.5 甲烷磺酸淋洗使用液,50.00 mmol/L

精密量取甲烷磺酸淋洗贮备液(4.3.4)50.00 mL,置于1 000 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。贮存于聚丙烯塑料瓶中,可保存3 d。

4.3.6 硝酸淋洗贮备液,1.00 mol/L

精密量取硝酸(4.2.2)35.40 mL,置于500 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。贮存于玻璃瓶中,可保存3 d,于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.3.7 硝酸淋洗使用液,1.00 mmol/L

精密量取硝酸淋洗贮备液(4.3.6)1.0 mL,置于1 000 mL量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀。贮存于玻璃瓶中,可保存3 d。

4.3.8 系统适用性溶液

取氯化钠0.02 g,加铵离子对照品中间液(4.3.2)0.15 mL,置于5 mL量瓶中,用水稀释至刻度,混匀后,作为系统适用性溶液。

4.3.9 供试品溶液

取培养用液1 mL,置于5 mL量瓶中,用水稀释至刻度,混匀后,转移至超滤离心管(4.2.5)中,9 500g离心10 min,取滤液作为供试品溶液。

4.4 仪器

4.4.1 离子色谱仪。离子色谱仪应包括高压输液泵、进样阀、分离柱、抑制器(选配)、电导检测器、数据处理系统(色谱工作站)等部件。淋洗液泵接触流动相的部件应为非金属材料,分离柱应使铵离子与锂离子、钠离子、钾离子、镁离子和钙离子等五种常见阳离子均能达到基线分离,铵离子与邻近阳离子间的

分离度不小于 1.5。

4.4.2 电子天平,精度为 0.01 mg。

4.4.3 高速离心机。

4.5 离子色谱条件

4.5.1 离子色谱分析参考条件

按照实际样品的基体及组成优化离子色谱分析条件。以下给出的离子色谱分析条件供参考。

4.5.2 参考条件 1

甲烷磺酸淋洗使用液体系分析参考条件见表 1。

表 1 甲烷磺酸淋洗使用液体系分析条件

项目	参数				
检测器类型	电导检测器				
色谱柱	阳离子分离柱(5×250 mm,大孔二乙烯基苯/乙基乙烯基苯基质、具有羧基功能团、高容量色谱柱)和阳离子保护柱(5×50 mm),或其他性能相当色谱柱				
抑制器	连续自动再生阳离子微膜抑制器或等效抑制装置				
流速	1.2 mL/min				
进样量	10 μL				
柱温	40 °C				
淋洗液程序	时间 min	A,水 %		B,甲烷磺酸淋洗使用液(4.3.5) %	
	0.000	60		40	
	10.000	60		40	
	11.000	0		100	
	20.000	0		100	
	20.100	60		40	
25.000	60		40		
注:淋洗液也可由商品化淋洗液发生器自动产生。					

4.5.3 参考条件 2

硝酸淋洗使用液体系分析参考条件见表 2。

表 2 硝酸淋洗使用液体系分析条件

项目	参数
检测器类型	电导检测器
色谱柱	阳离子分离柱(4×250 mm,大孔聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物基质、具有羧基功能团、高容量色谱柱)和阳离子保护柱(4.0×5 mm),或其他性能相当色谱柱

表 2 硝酸淋洗使用液体系分析条件（续）

项目	参数
流速	1.0 mL/min
进样量	10 μ L
柱温	40 $^{\circ}$ C
淋洗液	硝酸淋洗使用液(4.3.7)
分析时间	35 min
注：分析时间可根据实际样品调整。	

4.6 分析步骤

4.6.1 系统适用性试验

取系统适用性溶液(4.3.8)在 4.5 所述色谱条件下进样,系统适用性溶液色谱图中,钠离子与铵离子色谱峰的分度度应不小于 1.5。

4.6.2 标准曲线绘制

取铵离子对照品系列溶液(4.3.3),由低浓度到高浓度依次进样,以铵离子的质量浓度(μ g/mL)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。线性相关系数 r 应不低于 0.99。

4.6.3 供试品溶液测定

取供试品溶液(4.3.9),注入离子色谱仪,记录色谱图。若供试品溶液中铵离子质量浓度不在 0.03 μ g/mL~1 μ g/mL 范围,应重新取样,根据铵离子质量浓度采用合适的稀释倍数稀释,使铵离子质量浓度在线性范围内,再按照 4.3.9 所述方法离心制备供试品溶液。

4.7 结果计算与表示

4.7.1 结果计算

将供试品溶液色谱图中的峰面积代入标准曲线中,计算供试品溶液中铵离子的含量。样品中的铵离子含量按公式(1)计算。

$$C = C_1 \times f \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C —— 样品中铵离子的含量,单位为微克每毫升(μ g/mL);

C_1 —— 供试品溶液中铵离子的含量,单位为微克每毫升(μ g/mL);

f —— 稀释倍数,如按 4.3.9 制备样品,则为 5。

4.7.2 结果表示

取两次平行测定结果的算术平均值作为测定结果。

4.7.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 15%。

5 方法二：酶法

5.1 原理

在谷氨酸脱氢酶(GLDH)作用下,人类辅助生殖技术用培养用液中铵离子与 α -酮戊二酸和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)反应,生成谷氨酸和氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+),反应体系中 NADH 在 340 nm 波长处吸光度的下降程度与反应体系中铵离子的浓度呈正比关系。

注：本方法也可使用经过验证的具有相同反应原理的商品化氨检测试剂盒进行测试。

5.2 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 硫酸铵:优级纯。

5.2.2 三羟甲基氨基甲烷 $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$ 。

5.2.3 α -酮戊二酸($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5$)。

5.2.4 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)。

5.2.5 盐酸(HCl)。

5.2.6 氢氧化钠(NaOH)。

5.2.7 谷氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.2)(30 °C, NADH 为底物)。

5.3 溶液配制

5.3.1 试剂 I

精密称取三羟甲基氨基甲烷(5.2.2)9.44 g,置于 1 000 mL 量瓶中,加水 800 mL 搅拌至完全溶解,用盐酸(5.2.5)调节 pH 至 8.0 ± 0.05 后,加入谷氨酸脱氢酶(5.2.7),加水稀释至刻度,使溶液中谷氨酸脱氢酶的活性为 2 U/mL。4 °C 可保存 1 周。

5.3.2 试剂 II

精密称取三羟甲基氨基甲烷(5.2.2)4.72 g 和 α -酮戊二酸(5.2.3)2.58 g,置于 500 mL 量瓶中,加水 400 mL 搅拌至完全溶解,用氢氧化钠(5.2.6)调节 pH 至 9.0 ± 0.05 后,加入 NADH(5.2.4)0.625 g,待完全溶解后加水稀释至刻度。4 °C 可保存 1 周。

5.3.3 工作试剂

试剂 I 与试剂 II 按 4 : 1 的比例混合均匀,4 °C 可保存 1 周。

5.3.4 标准溶液制备

5.3.4.1 铵离子对照品贮备液,100 mmol/L

取硫酸铵适量,于 100 °C ~ 110 °C 干燥 2 h,取出后置于干燥器中冷却。精密称取 0.660 7 g,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,4 °C 可保存 1 年。也可以直接购买有证标准物质。

5.3.4.2 铵离子对照品中间液,1 mmol/L

精密量取铵离子对照品贮备液(5.3.4.1)1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,混匀。

5.3.4.3 铵离子对照品溶液, 100 $\mu\text{mol/L}$

精密量取铵离子对照品中间液(5.3.4.2)1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 混匀。

5.4 仪器

5.4.1 全自动生化分析仪。

5.4.2 电子天平, 精度为 0.01 mg。

5.5 分析步骤

分别取水(空白)、铵离子对照品溶液(5.3.4.3)和样品, 按照表 3 条件测试, 记录测试启动后 2 min 时的吸光度(A_1)和再孵育 3 min 后的吸光度(A_2)。计算各孔的 ΔA ($A_{\text{样品}}, A_{\text{标准}}, A_{\text{空白}}$), 即 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。若样品中铵离子浓度过高时, 样品应加水稀释至供试液中铵离子浓度在 20 $\mu\text{mol/L}$ ~400 $\mu\text{mol/L}$ 范围内。分析条件见表 3。

表 3 分析条件

项目	参数
反应温度	37 $^{\circ}\text{C}$
测定波长	主波长: 340 nm, 副波长: 405 nm
分析方法	两点速率法
取样体积	20 μL
工作试剂体积	240 μL
注 1: 参数是基于本文件试剂体系, 对不同的试剂体系, 参数可能存在差异, 测定前宜将参数优化到最佳。 注 2: 在 20 $\mu\text{mol/L}$ ~400 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 可定期采用多点校准验证系统的适用性。	

5.6 结果计算与表示

5.6.1 结果计算

样品中铵离子含量按公式(2)计算:

$$C = (\Delta A_{\text{样品}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times 100 \times f / (\Delta A_{\text{标准}} - \Delta A_{\text{空白}}) \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C —— 样品中铵离子的含量, 单位为微摩尔每升($\mu\text{mol/L}$)。

f —— 稀释倍数。

5.6.2 结果表示

取两次平行测定的算术平均值作为测定结果。

5.6.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果应满足以下要求: 当供试液中铵离子浓度在 [20 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$] 范围时, 两次独立测定结果的绝对差值应在 $\pm 8 \mu\text{mol/L}$ 范围内; 当供试液中铵离子浓度在 [50 $\mu\text{mol/L}$, 400 $\mu\text{mol/L}$] 范围时, 两次独立测定结果绝对差值应不超过算术平均值的 15%。

中华人民共和国医药
行业标准
人类辅助生殖技术用医疗器械
培养用液中铵离子的测定

YY/T 1852—2022

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

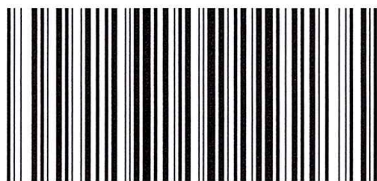
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 20 千字
2022年8月第一版 2022年8月第一次印刷

*

书号: 155066·2-36732 定价 20.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



YY/T 1852-2022



码上扫一扫 正版服务到