

使用氨基酸分析仪检测人类辅助生殖技术用 医疗器械培养液中的 19 种氨基酸 (钠型)

LC-298

摘要：《人类辅助生殖技术用医疗器械培养液中氨基酸检测方法 (YY/T 1695-2020)》于 2021 年 4 月 1 日实施，其中第一法为氨基酸分析仪法 (仲裁法)，本文使用岛津氨基酸分析仪建立了人类辅助生殖技术用医疗器械培养液中 19 种氨基酸的检测方法 (钠型)。采用外标法定量，实验结果显示，19 种氨基酸线性良好，相关系数均大于 0.999，空白样品中无干扰，各组分离度均满足要求。以保留时间和峰面积计算方法的精密度，RSD 分别在 0.01 %~0.19 % 和 0.08 %~4.60 % 之间。

关键词：氨基酸分析仪 钠型 YY/T 1695-2020

《人类辅助生殖技术用医疗器械培养液中氨基酸检测方法 (YY/T 1695-2020)》于 2020 年 3 月 31 日发布，已于 2021 年 4 月 1 日正式实施。标准中规定了三种方法，分别为氨基酸分析仪法、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，其中第一法 - 氨基酸分析仪法为仲裁方法。此标准涉及 19 种氨基酸，包括甘氨酸 (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 (Trp)、胱氨酸

((Cys)2)、赖氨酸 (Lys)、天冬氨酸 (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)。

氨基酸分析仪中使用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，在 570 nm 和 440 nm 波长下测定。

本文采用钠型系统建立了方法，分析时间短，分析效率高，各组分离度均满足要求。线性关系良好，仪器精密度优良，可用于此类样品的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-16×3

柱温箱：CTO-16L

检测器：SPD-16

自动进样器：SIL-16

脱气机：DGU-20A 5R

高温反应箱：CRB-40

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Na (100×6.0 mm I.D., 5 μm) (SGLC, P/N: S228-18837-91)

捕氨柱：Shim-pack ISC-30 /S0504 Na (50×4.0 mm I.D.) (SGLC, P/N: S228-14206-91)

洗脱液：钠型氨基酸分析流动相试剂包 (SGLC, P/N: S228-21195-94)

流速：0.6 mL/min

柱温：60°C

进样体积：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度 0%，洗脱程序见表 1

衍生液流速：0.2 mL/min

衍生反应温度：130°C

检测波长：570 nm/440 nm

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
9.00	泵	B.Conc	0
13.00	泵	B.Conc	7
17.20	泵	B.Conc	8
17.21	泵	B.Conc	11
20.80	泵	B.Conc	11
20.81	泵	B.Conc	50
22.00	泵	B.Conc	58
22.01	泵	B.Conc	100
28.80	泵	SV(Pump A)	B
29.30	泵	B.Conc	100
29.31	泵	B.Conc	0
33.00	泵	SV(Pump A)	A
35.00	泵	Total Flow	0.6
36.50	泵	Total Flow	0.7
43.30	泵	Total Flow	0.7
44.00	泵	Total Flow	0.6
45.00	控制器	Stop	

注：SV(PumpA) 表示 A 泵溶剂切换阀，“值”中选择 A 和 B 代表不同的流动相。

1.3 对照品与试样的制备

对照品溶液：配制牛磺酸和色氨酸的单标溶液，并与 17 种氨基酸混标混匀，除脯氨酸、胱氨酸、组氨酸与色氨酸外，用水将其余 15 种氨基酸稀释至 2.9~1500 $\mu\text{mol/L}$ （脯氨酸：11.7~1500 $\mu\text{mol/L}$ 、胱氨酸：1.5~750 $\mu\text{mol/L}$ 、组氨酸与色氨酸：2.9~750 $\mu\text{mol/L}$ ）系列浓度，4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存一周。

试样制备：取培养液样品 0.5 mL，加入 0.5 mL 4% 磺基水杨酸，混匀后 9500 g 离心 10 min，取 0.5 mL 上清液加入 0.5 mL 水，混匀后进样检测。

■ 结果与讨论

2.1 色谱图

对照品图谱见图 1，除脯氨酸（Pro）采用 440 nm 检测，其余 18 种氨基酸均采用 570 nm。结果显示，19 种氨基酸分离度均满足要求。此方法 45 分钟完成一次分析，19 种氨基酸在 35 分钟内全部出峰，分析时间短，分析效率高。

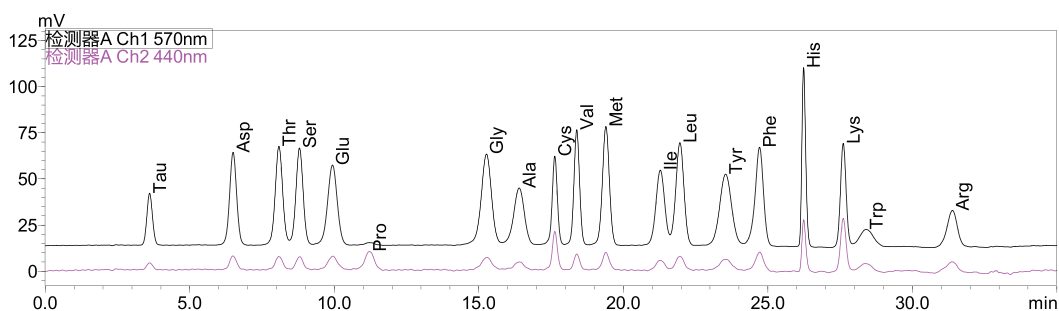


图1 对照品（胱氨酸与色氨酸浓度为 23.4 μM，其他 46.9 μM）色谱图

2.2 线性

取系列浓度对照品溶液进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法拟合校准曲线，部分氨基酸校准曲线如图2所示。校准曲线线性关系良好，相关系数均大于 0.999。线性方程、相关系数结果见表 2。

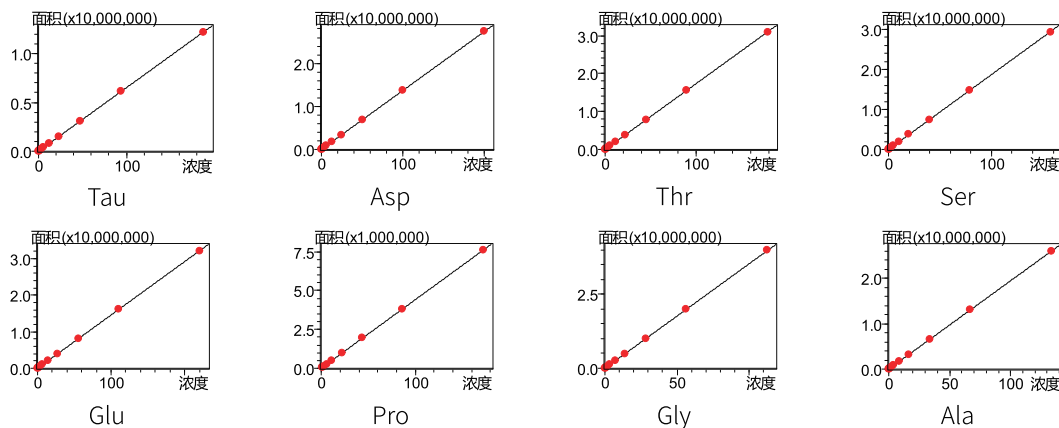


图2 部分校准曲线

表 2 线性结果

序号	氨基酸名称	简称	标准曲线	线性范围 (μmol/L)	相关系数 R	准确度 %
1	牛磺酸	Tau	$Y = (8151.67)X + (313.537)$	2.9~1500	0.9999	97.7~103.5
2	天冬氨酸	Asp	$Y = (18243.0)X + (-3832.26)$	2.9~1500	0.9999	98.8~102.2
3	苏氨酸	Thr	$Y = (20724.1)X + (-10315.6)$	2.9~1500	0.9999	98.3~102.5
4	丝氨酸	Ser	$Y = (19648.2)X + (-4947.88)$	2.9~1500	0.9999	98.1~103.2
5	谷氨酸	Glu	$Y = (21518.3)X + (-13914.4)$	2.9~1500	0.9999	97.4~104.1
6	脯氨酸	Pro	$Y = (5101.08)X + (1390.49)$	11.7~1500	0.9998	93.7~104.6
7	甘氨酸	Gly	$Y = (26504.1)X + (-23519.6)$	2.9~1500	0.9999	93.5~109.4
8	丙氨酸	Ala	$Y = (17326.6)X + (-13500.6)$	2.9~1500	0.9999	95.9~109.3
9	胱氨酸	(Cys)2	$Y = (26276.2)X + (8962.85)$	1.5~750	0.9999	96.4~108.7
10	缬氨酸	Val	$Y = (18039.6)X + (3277.93)$	2.9~1500	0.9999	96.7~104.1
11	甲硫氨酸	Met	$Y = (22906.8)X + (-7216.73)$	2.9~1500	0.9999	97.8~105.2
12	异亮氨酸	ILE	$Y = (18845.8)X + (-3169.99)$	2.9~1500	0.9999	95.8~106.2
13	亮氨酸	Leu	$Y = (23483.9)X + (530.466)$	2.9~1500	0.9999	98.1~101.3

14	酪氨酸	Tyr	$Y = (23957.4)X + (-11914.5)$	2.9~1500	0.9999	97.8~107.8
15	苯丙氨酸	Phe	$Y = (23009.5)X + (1859.97)$	2.9~1500	0.9999	96.1~105.0
16	组氨酸	His	$Y = (19298.5)X + (-28552.8)$	2.9~750	0.9999	97.9~103.4
17	赖氨酸	Lys	$Y = (17172.8)X + (-8562.03)$	2.9~1500	0.9999	97.4~105.6
18	色氨酸	Trp	$Y = (13799.0)X + (-7323.11)$	2.9~750	0.9999	97.3~104.6
19	精氨酸	Arg	$Y = (10630.7)X + (-8475.72)$	2.9~1500	0.9999	94.7~113.6

2.3 精密度

取低（胱氨酸和色氨酸为 23.438 $\mu\text{mol/L}$ ，其余 46.875 $\mu\text{mol/L}$ ）、高（胱氨酸和色氨酸为 187.5 $\mu\text{mol/L}$ ，其余 375 $\mu\text{mol/L}$ ）两个浓度对照品溶液，连续进样测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的相对标准偏差如表 3 所示，RSD 分别在 0.01 %~0.19 % 和 0.08 %~4.60 % 之间，仪器精密度良好。

表 3 保留时间和峰面积精密度结果 (n=6)

序号	氨基酸名称	低浓度		高浓度	
		保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)	保留时间 (RSD%)	峰面积 (RSD%)
1	Tau	0.11	0.45	0.09	0.23
2	Asp	0.09	0.27	0.19	0.11
3	Thr	0.07	0.22	0.12	0.16
4	Ser	0.07	0.13	0.11	0.12
5	Glu	0.08	0.33	0.11	0.10
6	Pro	0.08	4.60	0.09	1.27
7	Gly	0.03	0.76	0.06	0.14
8	Ala	0.03	0.65	0.05	0.25
9	(Cys)2	0.05	0.50	0.04	0.09
10	Val	0.04	0.38	0.04	0.18
11	Met	0.04	0.76	0.04	0.27
12	ILE	0.04	0.48	0.05	0.15
13	Leu	0.03	0.29	0.04	0.14
14	Tyr	0.03	1.01	0.03	0.18
15	Phe	0.03	0.47	0.01	0.08
16	His	0.02	0.46	0.01	0.11
17	Lys	0.02	0.57	0.02	0.14
18	Trp	0.02	2.74	0.01	0.45
19	Arg	0.01	1.07	0.01	0.24

2.4 样品测定及加标回收率

取培养液样品照 1.3 节处理，进样测定，并在样品中加入低（胱氨酸和色氨酸为 23.438 $\mu\text{mol/L}$ ，其余 46.875 $\mu\text{mol/L}$ ）、高（胱氨酸和色氨酸为 187.5 $\mu\text{mol/L}$ ，其余 375 $\mu\text{mol/L}$ ）两浓度 19 种氨基酸混标，进样测定，计算加标回收率。

$$\text{回收率}\% = \frac{C_{\text{加标}} - C_{\text{样品}}}{C_{\text{添加}}} \times 100\%$$

样品测定及加标回收率具体结果如表 4 所示，样品的加标回收率在 98.59~108.38% 之间，表明该方法准确度良好。

表 4 样品测定及加标回收率结果

序号	氨基酸名称	样品浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	添加浓度 - 低 ($\mu\text{mol/L}$)	加标样品 - 低 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 - 低 (%)	添加浓度 - 高 ($\mu\text{mol/L}$)	加标样品 - 高 ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 - 高 (%)
1	Tau	N.D.	46.875	47.847	102.07	375.000	392.893	104.77
2	Asp	3.191	46.875	50.695	101.34	375.000	397.072	105.03
3	Thr	7.807	46.875	55.398	101.53	375.000	402.723	105.31
4	Ser	8.544	46.875	55.833	100.88	375.000	403.423	105.30
5	Glu	22.785	46.875	68.998	98.59	375.000	416.105	104.89
6	Pro	8.885	46.875	58.618	106.10	375.000	397.310	103.58
7	Gly	9.861	46.875	56.964	100.49	375.000	406.880	105.87
8	Ala	32.856	46.875	79.666	99.86	375.000	428.875	105.61
9	(Cys)2	N.D.	23.438	23.586	100.63	187.500	198.552	105.89
10	Val	12.785	46.875	60.247	101.25	375.000	411.166	106.23
11	Met	1.908	46.875	50.712	104.12	375.000	408.335	108.38
12	ILE	3.571	46.875	50.251	99.58	375.000	397.004	104.92
13	Leu	18.572	46.875	65.525	100.17	375.000	412.847	105.14
14	Tyr	4.630	46.875	51.393	99.76	375.000	398.203	104.95
15	Phe	7.260	46.875	54.141	100.01	375.000	402.576	105.42
16	His	5.878	46.875	53.405	101.39	375.000	402.109	105.66
17	Lys	12.983	46.875	59.327	98.87	375.000	399.880	103.17
18	Trp	2.158	23.438	25.878	101.21	187.500	199.682	105.35
19	Arg	6.106	46.875	53.250	100.57	375.000	392.416	103.02

N.D.: 未检出

■ 结论

为应对 YY/T 1695-2020 标准的实施，立足于岛津氨基酸分析仪 LC-16AAA 新产品，本文建立了钠型体系的氨基酸分析仪法用于人类辅助生殖技术用医疗器械培养液中 19 种氨基酸的含量测定。该方法准确可靠，各项指标均满足标准要求，可用于此类医疗器械的检测。

岛津应用云

