

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（锂型）

LC-362

摘要： 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（锂型）。采用外标法定量，19 种氨基酸线性良好，相关系数均大于 0.9997。精密度实验中，保留时间的 RSD 在 0.01 %~0.33 % 之间，峰面积的 RSD 在 0.69 %~3.70 % 之间。各组分分离度满足 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》第一法氨基酸分析法（仲裁法）的要求，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 氨基酸分析仪 锂型 YY/T 1695-2020

技术特点：

- ❖ 使用柠檬酸锂缓冲液，建立了锂型离子交换色谱柱的氨基酸分析方法。
- ❖ 分离度高，满足 YY/T 1695-2020 标准要求。

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》于 2021 年 4 月 1 日实施。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医疗器械培养液中氨基酸成分，其中，第一法—氨基酸分析法为仲裁方法。

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）、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）。

本文参考 YY/T 1695-2020，采用柠檬酸锂缓冲液体系，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。各组分分离度满足标准要求，线性关系、仪器精密度良好，可为相关从业人员提供参考。

■ 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

化学反应箱：CRB-40

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Amino-Li (100 mm×6.0 mm I.D., 5μm, SGLC, P/N: 228-18837-92)

捕氨柱：Shim-pack ISC-30 /S0504 Li (50 mm×4.0 mm I.D., SGLC, P/N: 228-00821-91)

洗脱液：锂型氨基酸分析流动相试剂包 (SGLC, P/N: 228-21195-95)

衍生试剂：茚三酮衍生试剂 (SGLC, P/N: AW208-09626)

流速：0.6 mL/min

衍生液流速：0.2 mL/min

柱温：39°C

衍生反应温度：130°C

进样体积：20 μL

检测波长：570 nm/440 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度 0%，洗脱程序见表 1

SV(Pump A)：A 泵溶剂切换阀，初始值 A

表 1 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | 单元 | 处理命令 | 值 |
|----------|-----|------------|-----|
| 22.00 | 泵 | B.Conc | 0 |
| 24.00 | 泵 | B.Conc | 1 |
| 28.50 | 泵 | B.Conc | 1 |
| 28.51 | 泵 | B.Conc | 4 |
| 28.51 | 泵 | B.Curve | 4 |
| 56.00 | 泵 | B.Conc | 6 |
| 56.01 | 泵 | B.Conc | 9 |
| 69.00 | 泵 | B.Conc | 9 |
| 69.00 | 泵 | B.Curve | -2 |
| 86.00 | 泵 | B.Conc | 29 |
| 86.01 | 泵 | B.Conc | 34 |
| 86.01 | 泵 | B.Curve | -2 |
| 108.00 | 泵 | B.Conc | 51 |
| 108.01 | 泵 | B.Conc | 61 |
| 111.00 | 泵 | B.Conc | 68 |
| 111.01 | 泵 | B.Conc | 100 |
| 133.00 | 泵 | SV(Pump A) | B |
| 143.70 | 泵 | B.Conc | 100 |
| 143.71 | 泵 | B.Conc | 0 |
| 147.70 | 泵 | SV(Pump A) | A |
| 163.00 | 控制器 | Stop | |

1.3 对照品溶液配制

牛磺酸、色氨酸对照品储备液：取牛磺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，制成牛磺酸对照品储备液，浓度为 2.5 mmol/L。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，浓度为 1.25 mmol/L。

17 种氨基酸对照品储备液：0.1 mol/L 盐酸溶液中的 17 种氨基酸，其中丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、缬氨酸浓度各 2.5 mmol/L，胱氨酸浓度为 1.25 mmol/L。

混合氨基酸对照品系列溶液：取以上三种氨基酸对照品储备液各适量，置于同一容量瓶中，加水稀释配制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，其中牛磺酸、天冬氨酸、丝氨酸、甘氨酸、丙氨酸、甲硫氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸浓度各在 2.9~1500 $\mu\text{mol/L}$ 范围，苏氨酸、谷氨酸、脯氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸浓度各在 5.9~1500 $\mu\text{mol/L}$ 范围，精氨酸 11.7~1500 $\mu\text{mol/L}$ ，胱氨酸 1.5~750 $\mu\text{mol/L}$ ，色氨酸 5.9~750 $\mu\text{mol/L}$ ，4°C 冰箱可保存一周。

1.4 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

对照品溶液色谱图见图 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标准要求（YY/T 1695-2020 中 4.8.1 分离度 各氨基酸分离度 $\geq 85\%$ ）。

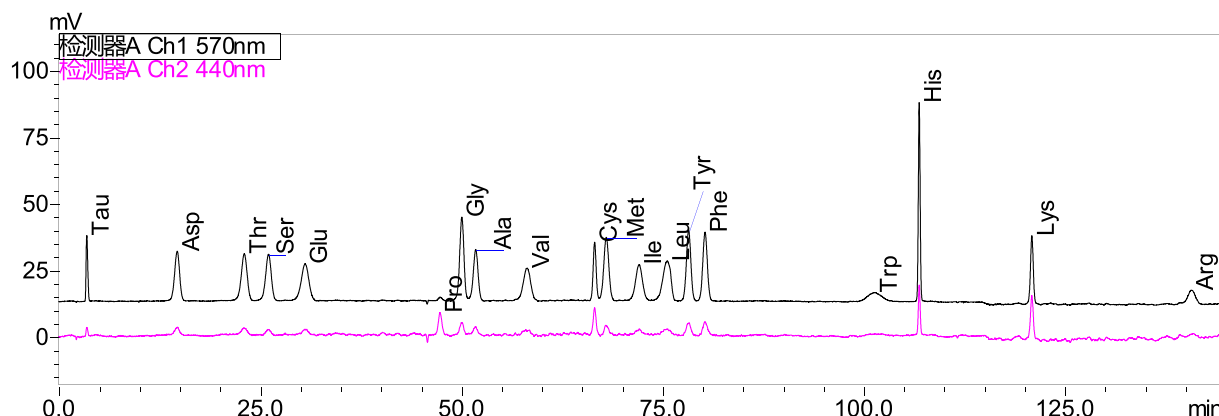


图 1 对照品溶液色谱图（胱氨酸与色氨酸浓度为 23.4 $\mu\text{mol/L}$ ，其他 46.9 $\mu\text{mol/L}$ ）

2.2 校准曲线

按照 1.2 项下分析条件，对混合氨基酸对照品系列溶液进样分析，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法拟合校准曲线。各氨基酸线性关系良好，相关系数均大于 0.9997，校准曲线信息如表 2 所示。

表 2 19 种氨基酸校准曲线

| 序号 | 氨基酸名称 | 简称 | 校准曲线 | 线性范围 ($\mu\text{mol/L}$) | 相关系数 r | 准确度 (%) |
|----|-------|-----|-------------------------------|----------------------------|--------|------------|
| 1 | 牛磺酸 | Tau | $Y = (7703.55)X + (-1456.34)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 98.8~100.9 |
| 2 | 天冬氨酸 | Asp | $Y = (17465.5)X + (-5876.98)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 97.9~103.2 |
| 3 | 苏氨酸 | Thr | $Y = (19439.6)X + (-1233.54)$ | 5.9~1500 | 0.9999 | 98.9~101.0 |
| 4 | 丝氨酸 | Ser | $Y = (18879.4)X + (-7534.74)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 93.6~106.5 |
| 5 | 谷氨酸 | Glu | $Y = (20198.6)X + (9900.39)$ | 5.9~1500 | 0.9999 | 94.5~103.7 |
| 6 | 脯氨酸 | Pro | $Y = (5295.27)X + (2252.15)$ | 5.9~1500 | 0.9997 | 93.6~104.7 |
| 7 | 甘氨酸 | Gly | $Y = (25403.6)X + (2275.98)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 95.5~103.4 |
| 8 | 丙氨酸 | Ala | $Y = (17104.9)X + (6535.56)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 90.7~109.2 |
| 9 | 胱氨酸 | Cys | $Y = (25515.0)X + (-8381.47)$ | 1.5~750 | 0.9999 | 97.9~102.3 |
| 10 | 缬氨酸 | Val | $Y = (17113.2)X + (-3180.87)$ | 5.9~1500 | 0.9999 | 99.0~101.3 |
| 11 | 甲硫氨酸 | Met | $Y = (22915.3)X + (-13819.0)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 97.1~102.8 |
| 12 | 异亮氨酸 | ILE | $Y = (17673.9)X + (4086.97)$ | 5.9~1500 | 0.9999 | 92.4~103.5 |
| 13 | 亮氨酸 | Leu | $Y = (22275.3)X + (6074.37)$ | 5.9~1500 | 0.9999 | 96.9~101.9 |
| 14 | 酪氨酸 | Tyr | $Y = (22392.8)X + (2915.58)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 97.9~101.8 |
| 15 | 苯丙氨酸 | Phe | $Y = (21736.4)X + (4052.25)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 94.7~107.4 |
| 16 | 组氨酸 | His | $Y = (24680.5)X + (2209.05)$ | 2.9~1500 | 0.9999 | 97.5~101.9 |
| 17 | 赖氨酸 | Lys | $Y = (14623.2)X + (-11056.6)$ | 2.9~1500 | 0.9998 | 95.2~110.7 |
| 18 | 色氨酸 | Trp | $Y = (18669.0)X + (-175.793)$ | 5.9~750 | 0.9999 | 93.3~105.3 |
| 19 | 精氨酸 | Arg | $Y = (8365.76)X + (-18361.5)$ | 11.7~1500 | 0.9998 | 97.5~102.6 |

2.3 精密度

对 46.9 μmol/L (胱氨酸和色氨酸为 23.4 μmol/L) 的混合氨基酸对照品溶液连续测定 6 次, 考察仪器精密度, 所得结果见表 3。结果显示, 19 种氨基酸保留时间的 RSD 在 0.01 %~0.33 % 之间, 峰面积的 RSD 在 0.69 %~3.70 % 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 | 保留时间 RSD(%) | 峰面积 RSD(%) |
|----|-------|-------------|------------|
| 1 | Tau | 0.04 | 1.45 |
| 2 | Asp | 0.33 | 1.58 |
| 3 | Thr | 0.20 | 1.70 |
| 4 | Ser | 0.15 | 1.14 |
| 5 | Glu | 0.09 | 0.77 |
| 6 | Pro | 0.03 | 3.70 |
| 7 | Gly | 0.05 | 0.81 |
| 8 | Ala | 0.05 | 1.09 |
| 9 | Cys | 0.02 | 1.21 |
| 10 | Val | 0.03 | 2.13 |
| 11 | Met | 0.02 | 1.09 |
| 12 | ILE | 0.04 | 2.03 |
| 13 | Leu | 0.01 | 1.18 |
| 14 | Tyr | 0.02 | 0.69 |
| 15 | Phe | 0.01 | 0.91 |
| 16 | His | 0.01 | 0.71 |
| 17 | Lys | 0.01 | 1.26 |
| 18 | Trp | 0.07 | 2.19 |
| 19 | Arg | 0.03 | 3.31 |

2.4 样品测定及加标回收率

取培养液样品按照 1.3 节处理, 进样测定。在样品中加入低、高两浓度 19 种氨基酸混合对照品溶液, 进样测定, 计算加标回收率。

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

样品浓度、添加浓度及加标回收率结果如表 4 所示, 19 种氨基酸的加标回收率在 94.2~114.0% 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 (μmol/L) | 添加浓度 (μmol/L) | 加标浓度 (μmol/L) | 回收率 (%) | RSD(%) |
|----|-------|---------------|---------------|---------------|---------|--------|
| 1 | Tau | N.D. | 46.9 | 50.30 | 107.3 | 0.59 |
| | | | 375.0 | 400.02 | 106.7 | 1.08 |
| 2 | Asp | N.D. | 46.9 | 52.28 | 111.5 | 0.68 |
| | | | 375.0 | 411.07 | 109.6 | 1.04 |
| 3 | Thr | 10.55 | 46.9 | 61.81 | 109.4 | 1.49 |
| | | | 375.0 | 420.78 | 109.4 | 0.79 |

| | | | | | | |
|----|-----|-------|-------|--------|-------|------|
| 4 | Ser | 11.37 | 46.9 | 60.51 | 104.8 | 1.03 |
| | | | 375.0 | 417.92 | 108.4 | 1.10 |
| 5 | Glu | 4.90 | 46.9 | 55.44 | 107.8 | 1.30 |
| | | | 375.0 | 416.59 | 109.8 | 1.44 |
| 6 | Pro | N.D. | 46.9 | 46.90 | 100.1 | 0.92 |
| | | | 375.0 | 364.20 | 97.1 | 1.19 |
| 7 | Gly | 12.21 | 46.9 | 60.90 | 103.9 | 0.42 |
| | | | 375.0 | 409.99 | 106.1 | 0.86 |
| 8 | Ala | 47.31 | 46.9 | 91.47 | 94.2 | 1.10 |
| | | | 375.0 | 427.86 | 101.5 | 0.84 |
| 9 | Cys | 1.98 | 23.4 | 25.09 | 98.6 | 1.25 |
| | | | 187.5 | 194.20 | 102.5 | 1.13 |
| 10 | Val | 20.88 | 46.9 | 70.84 | 106.6 | 1.16 |
| | | | 375.0 | 426.08 | 108.0 | 1.43 |
| 11 | Met | N.D. | 46.9 | 50.73 | 108.2 | 0.18 |
| | | | 375.0 | 388.35 | 103.6 | 1.05 |
| 12 | ILE | N.D. | 46.9 | 53.37 | 113.8 | 1.69 |
| | | | 375.0 | 407.39 | 108.6 | 0.86 |
| 13 | Leu | 23.54 | 46.9 | 73.66 | 106.9 | 1.07 |
| | | | 375.0 | 433.08 | 109.2 | 0.87 |
| 14 | Tyr | 5.56 | 46.9 | 57.23 | 110.2 | 0.80 |
| | | | 375.0 | 418.47 | 110.1 | 0.90 |
| 15 | Phe | 9.46 | 46.9 | 61.24 | 110.5 | 0.97 |
| | | | 375.0 | 421.51 | 109.9 | 0.90 |
| 16 | His | 4.84 | 46.9 | 58.27 | 114.0 | 0.62 |
| | | | 375.0 | 431.97 | 113.9 | 0.99 |
| 17 | Lys | 19.32 | 46.9 | 66.31 | 100.2 | 0.62 |
| | | | 375.0 | 394.11 | 100.0 | 1.74 |
| 18 | Trp | N.D. | 23.4 | 24.94 | 106.4 | 0.65 |
| | | | 187.5 | 211.42 | 112.8 | 1.73 |
| 19 | Arg | N.D. | 46.9 | 50.27 | 107.2 | 0.80 |
| | | | 375.0 | 388.46 | 103.6 | 0.91 |

N.D.: 未检出

■ 结论

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(锂型)。该方法准确可靠,精密度良好,满足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》第一法氨基酸分析法(仲裁法)的要求,可用于此类医疗器械相关的检测。

岛津应用云

