



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

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

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前言	II
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	1
5 方法二：酶法	4

征求意见稿

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：

本文件主要起草人：

人类辅助生殖技术用医疗器械 培养液中铵离子的测定

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液中氨基酸和/或蛋白质会降解出氨，在培养液中以铵离子形式存在，含量以 NH_4^+ 计。

4 方法一：离子色谱法

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洗脱液带入装有填充剂的色谱柱，铵离子与其它阳离子分离后，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

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。

4.2.1 甲烷磺酸：优级纯；

4.2.2 硫酸铵：优级纯；

4.2.3 氯化钠：分析纯；

4.2.4 超滤离心管：Amicon® Ultra-4, 30K, 或其它性能相当者。

4.3 溶液配制

4.3.1 铵离子对照品贮备液，1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

精密称取硫酸铵（4.2.2）0.3671g，置100mL量瓶中，加适量水使硫酸铵溶解并稀释至刻度，摇匀。用聚丙烯或高密度聚乙烯瓶贮存。该溶液可在避光、4℃下存放一个月。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）1mL，置100mL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 、1000 μL ，置10mL量瓶中，用水稀释至刻度，使铵离子浓度在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，1.00mol/L

精密量取甲烷磺酸（4.2.1）32.36mL，置500mL量瓶中，加适量水使甲烷磺酸溶解并稀释至刻度，摇匀。贮存于聚乙烯塑料瓶中，于4℃内避光保存。

4.3.5 甲烷磺酸淋洗使用液，50.00mmol/L

精密量取甲烷磺酸淋洗贮备液（4.3.4）50.00ml，置1000ml量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。贮存于聚乙烯塑料瓶中，可保存3天。

4.4 系统适用性溶液

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

4.5 供试品溶液

取培养用液1mL，置5mL量瓶中，用水稀释至刻度，混匀后，转移至超滤离心管（4.2.4）中，9500g离心10min，取滤液作为供试品溶液。

4.6 仪器

4.6.1 离子色谱仪

离子色谱仪应包括淋洗液泵、进样阀、分离柱、抑制器、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，铵离子和钠离子分离度不小于 4.0，其它分离度不小于 1.5。

4.6.2 电子天平，精度为 0.01mg。

4.6.3 高速离心机

4.7 离子色谱条件

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、具有羧酸基功能团、高容量色谱柱）和阳离子保护柱（5×50mm），或其它性能相当色谱柱；

抑制器：连续自动再生阳离子微膜抑制器或等效抑制装置；

流动相：甲烷磺酸溶液，梯度淋洗时间和甲烷磺酸浓度见表1，也可由商品化淋洗液发生器自动产生。

表1 梯度淋洗条件

时间 (min)	甲烷磺酸浓度 (mmol/L)
0.000	20
10.000	20
11.000	50
20.000	50
20.100	20
25.000	20

流速：1.2 mL/min；

柱温：40 ℃；

进样量：10 μ L。

4.8 分析步骤

4.8.1 系统适用性试验

取系统适用性溶液（4.4）在 4.7 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离度应不小于 4.0。

4.8.2 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。

4.8.3 供试品溶液测定

取供试品溶液（4.5），注入离子色谱仪，记录色谱图。若供试品溶液中铵离子浓度不在 0.03 μ g/mL-1 μ g/mL 范围，应重新取样，按照（4.5）重新制备供试液，将铵离子浓度稀释至该范围并测定。

4.9 结果计算与表示

4.9.1 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）

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

式中：C——样品中铵离子的含量， $\mu\text{g/mL}$ ；

C_1 ——供试品溶液中铵离子的含量， $\mu\text{g/mL}$ ；

f——稀释倍数，如按4.5制备样品，则为5。

4.9.2 结果表示

取两次平行测定的算术平均值作为测定结果。

5 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340nm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）

5.3 溶液配制

5.3.1 试剂1

精密称取三羟甲基氨基甲烷（5.2.2）9.44g，置1000mL量瓶中，加水800mL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2U/mL。4℃可保存1周。

5.3.2 试剂2

精密称取三羟甲基氨基甲烷 (5.2.2) 4.72g和 α -酮戊二酸 (5.2.3) 2.58g, 置500mL量瓶中, 加水400mL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) 0.625g, 待完全溶解后加水稀释至刻度。4℃可保存1周。

5.3.3 工作试剂

试剂1与试剂2按4: 1的比例混合均匀, 4℃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, 100mmol/L

取硫酸铵适量, 于100~110℃干燥2小时, 取出后置干燥器中冷却。精密称取660.7mg, 置100mL量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 4℃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, 1mmol/L

精密量取铵离子对照品贮备液 (5.3.4.1) 1mL, 置100mL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 μ mol/L

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

5.4 仪器

5.4.1 酶标仪或全自动生化分析仪

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1条件测试, 记录测试启动后2分钟时的吸光度 (A1) 和再孵育3分钟后的吸光度 (A2)。计算各孔的 ΔA (A样品, A标准, A空白), 即 $\Delta A = A1 - A2$ 。若样品的 ΔA 超过对照品溶液, 样品加水稀释至供试液中铵离子浓度在16.5 μ mol/L-100 μ mol/L范围内。加样步骤和仪器分析参数见表2。

表2 加样步骤和仪器分析参数

加样步骤				
	空白 (μ L)	对照品溶液 (μ L)	样品 (μ L)	工作试剂 (μ L)
空白	20			240
对照品		20		240
样品			20	240
分析参数				
反应温度	37℃			
测定波长	主波长: 340nm, 副波长: 405nm			

注1: 表1分析参数是基于本标准试剂体系, 对不同的试剂体系, 参数可能存在差异, 测定前应将参数优化到最佳。

注2: 如采用全自动生化分析仪分析, 分析方法为两点速率法。

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:

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

式中:

C ——样品中铵离子的含量, $\mu\text{mol/L}$ 。

f ——稀释倍数, 如需要。

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。