中图分类号:R917　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2024)12－0062－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.12.014

人类辅助生殖技术用液中铵离子含量影响因素分析

管瑞芹[1,2],赵丹妹[1],姜爱莉[2],柯林楠[1△],王召旭[1]

(1. 中国食品药品检定研究院,北京　102629;　2. 烟台大学,山东 烟台　264005)

摘要:目的　为人类辅助生殖技术(ART)用液产品中铵离子含量的控制及储存条件提供参考。**方法**　选择市场上6个厂家17批不同作用的ART用液,使用离子色谱法测定铵离子含量,并分析储存温度和储存时间对铵离子含量的影响。**结果**　货架有效期内,冷冻液套装、解冻液套装、培养液、处理液中铵离子含量分别为0.89～3.34 μg/mL,0.88～4.68 μg/mL,0.75～1.45 μg/mL,0.38～3.89 μg/mL。胚胎培养液中铵离子含量,37 ℃储存时30 d内从0.9 μg/mL升至3.1 μg/mL,4 ℃储存时240 d内从0.6 μg/mL升至1.7 μg/mL。**结论**　不同作用ART用液中铵离子含量存在差异,且与产品的储存温度、储存时间呈正相关。在进行货架有效期制订时,应考虑产品中铵离子含量。

关键词:人类辅助生殖技术;液体类产品;离子色谱法;铵离子;含量测定;质量控制;储存温度;储存时间

Analysis of Factors Affecting the Content of Ammonium Ions in Fluids for Assisted Reproductive Technology

GUAN Ruiqin[1,2], ZHAO Danmei[1], JIANG Aili[2], KE Linnan[1], WANG Zhaoxu[1]

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China　102629;　2. Yantai University, Yantai, Shandong, China　264005)

Abstract: Objective　To provide a reference for the control of ammonium ion content and storage of fluids for assisted reproductive technology (ART). **Methods**　Seventeen batches of ART fluids with different functions from six manufacturers on the market were selected, the ion chromatography (IC) method was used to determine the ammonium ion content, and the effects of storage temperature and storage time on the ammonium ion content were analyzed. **Results**　During the shelf－life, the ammonium ion contents of refrigerant kit, thawing fluid kit, medium and handling fluids were in the range of 0.89 to 3.34 μg/mL, 0.88 to 4.68 μg/mL, 0.75 to 1.45 μg/mL, 0.38 to 3.89 μg/mL respectively. The content of ammonium ions in embryo culture fluids increased from 0.9 μg/mL to 3.1 μg/mL stored at 37 ℃ within 30 d, and from 0.6 μg/mL to 1.7 μg/mL stored at 4 ℃ within 240 d. **Conclusion**　The contents of ammonium ions in ART fluids with different functions are diverse, and they are positively correlated with the storage temperature and storage time of the products. The ammonium ion content in the products should be considered when formulating the shelf－life.

Key words: assisted reproductive technology; fluid product; ion chromatography; ammonium ion; content determination; quality control; storage temperature; storage time

近年来,我国育龄夫妇不孕不育率持续攀升,已成为备受关注的社会问题。自1978年世界首例试管婴儿诞生以来,人类辅助生殖技术(ART)得到迅速发展并日趋完善,现已成为治疗不孕不育疾病的重要手段之一[1]。ART实施过程中使用的相关医疗器械主要包括液体类产品、器具耗材类产品及专用设备等[2]。其中液体类产品在辅助生殖过程中用以准备、培养、转移或储存人类配子和/或胚胎[3],为配子培养和胚胎生长发育提供各种所需营养物质,其质量不仅影响患者的使用,而且可能影响后代的发育和健康,因此,液体类医疗产品的安全性、有效性和稳定性日益受到关注。国家药品监督管理局(简称国家药监局)2018年发布的《人类体外辅助生殖技术用液注册技术审查指导原则》指出,除要对添加的组分定量外,还要对关键组分的降解情况、有害降解产物的生成情况进行研究,并分析对产品潜在安全性及有效性的影响。商品化的ART用液中通常会添加糖类、氨基酸、人血清白蛋白、无机盐、维生素、生长因子、抗生素等成分[4],其中某些组分如谷氨酰胺等氨基酸和蛋白质性质不稳定,货架有效期(指医疗器械终产品储存时发挥预期功能的期限)内会分解出氨,积累到一定量时会影响胚胎的存活和发育[5-6],因此有必要控制ART用液中氨的含量。氨极易溶于水,而ART用液的pH在7.2～7.4,在此条件下,分解出的氨会完全转化成铵离子,测定铵离子含量,即可确定液体中的氨含量。基于此,本研究中采用离子色谱法[7]测定目前市场上不同种类和作用的ART用液中铵离子含量,为后续ART液体类医疗器械产品的质量评价提供数据支持,也为制订产品货架有效期和限定有害降解产物氨

第一作者:管瑞芹,女,硕士研究生,研究方向为生物工程,(电子信箱)guanguan9510@163.com。

△通信作者:柯林楠,女,硕士研究生,主任技师,研究方向为无源医疗器械临床前评价,(电子信箱)kelinnan@sina.com。

的安全阈值提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

940 Professional IC Vario 型离子色谱仪（瑞士 Metrohm 公司）；Sigma 3K15 型高速离心机（德国 Sigma 公司）；Millipore - Q Reference 型超纯水系统（美国 Millipore 公司）。

1.2 试剂

ART 用液样品来源为检验机构的留样（来自 6 个生产厂家，共 17 批）[8]，详见表 1，其中冷冻液即玻璃化冷冻液套装，包含平衡液和冷冻液 2 种液体，在胚胎冷冻过程中起到将细胞内水分和冷冻保护剂充分置换和平衡的作用，解冻液即玻璃化解冻液套装（包含解冻液、稀释液、洗涤液 3 种液体），处理液 4 为精子冻存液，4 ℃下储存；硫酸铵（国药集团化学试剂有限公司，批号为 20190724）；硝酸为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

样品	批号	厂家	样品	批号	厂家
冷冻液 1	IF01202200701	厂家 1	培养液 2	211207	厂家 5
冷冻液 2	20220603	厂家 2	培养液 3	509470	厂家 6
冷冻液 3	2021072103	厂家 3	处理液 1	220607	厂家 4
冷冻液 4	220214	厂家 4	处理液 2	220606	厂家 4
解冻液 1	IF02202200701	厂家 1	处理液 3	220725	厂家 4
解冻液 2	20220603	厂家 2	处理液 4	220727	厂家 4
解冻液 3	2021072103	厂家 3	处理液 5	IF03202200501	厂家 1
解冻液 4	211122	厂家 4	处理液 6	IF04202200501	厂家 1
培养液 1	20220802	厂家 4			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

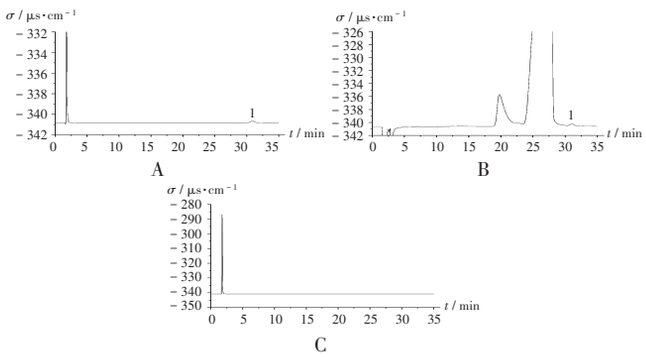
色谱柱：Metrosep C supp 2 - 250 / 4.0 离子色谱柱（250 mm × 4.0 mm，2 μm）；流动相：1 mmol / L 硝酸水溶液；流速：1 mL / min；柱温：40 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

取硫酸铵 0.038 8 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加水溶解并定容，摇匀，即得铵离子质量浓度为 100 μg / mL 的对照品贮备液；精密量取 1 mL，置 10 mL 容量瓶中，加水定容，摇匀，得质量浓度为 10 μg / mL 的铵离子对照品溶液中，分别量取 30，150，300，600，1 000 μL，置 10 mL 容量瓶，加水定容，摇匀，即得质量浓度分别为 0.03，0.15，0.3，0.6，1.0 μg / mL 的系列对照品溶液。精密量取 ART 用液 1 mL，置 5 mL 容量瓶中，用水稀释，定容，混匀，4 ℃、10 000 r / min 离心 10 min，取滤液，即得供试品溶液。以水为空白溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验：分别取 2.2 项下对照品溶液、供试品溶液、空白溶液各适量，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果供试品溶液色谱中，在与对照品溶液色谱相同位置有相应色谱峰，且空白溶液无干扰，表明方法专属性良好。详见图 1。



1. 铵离子

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白溶液

图 1 离子色谱图

1. Ammonium ion

A. Reference solution B. Test solution C. Blank solution

Fig. 1 IC chromatograms

线性关系考察：取 2.2 项下系列对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以铵离子质量浓度（C，μg / mL）为横坐标、峰面积（A）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $A = 0.158\,3\,C - 0.001\,7$（$r = 0.999$，$n = 5$）。结果表明，铵离子质量浓度在 0.03 ~ 1 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察：取 2.2 项下系列对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件进样测定，以信噪比（S / N）为 3，10 时待测离子的质量浓度分别为检测限和定量限，结果分别为 0.006，0.03 μg / mL。

精密度试验：取 2.2 项下对照品溶液适量（质量浓度为 0.3 μg / mL），按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 5 次，记录峰面积。结果的 RSD 为 1.51%（$n = 5$），表明仪器精密度良好。

重复性试验：取样品（批号 20220802）1 mL，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，平行 5 份，按 2.1 项下色谱条件进样测定，计算铵离子含量。结果铵离子平均含量为 0.75 μg / mL，RSD 为 3.03%（$n = 5$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取样品（批号 20220603）1 mL，共 6 份，精密加入对照品溶液适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 铵离子含量测定

2.4.1 常规测定

取不同厂家样品各 1 mL，按 2.2 项下方法制备供试

表2 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
1.89	2.00	3.67	94.34	97.00	1.69
1.89	2.00	3.75	96.40		
1.89	2.00	3.80	97.69		
1.89	2.00	3.76	96.66		
1.89	2.00	3.80	97.69		
1.89	2.00	3.86	99.23		

品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，采用外标法计算铵离子含量。在货架有效期内，冷冻液套装中，铵离子含量在玻璃化冷冻液套装1（平衡液，冷冻液）中均最低，在玻璃化冷冻液套装4（平衡液，冷冻液）中均最高；解冻液套装中，铵离子含量在玻璃化解冻液1（解冻液、稀释液、洗涤液）中均最低，在解冻液4（解冻液、稀释液、洗涤液）中均最高。详见表3。培养液中，培养液2（1.42 μg/mL）与培养液3（1.45 μg/mL）中铵离子含量接近，培养液1中最低（0.75 μg/mL）。处理液1－6中铵离子含量分别为0.94，1.71，0.38，2.86，3.89，0.47 μg/mL。

表3 冷冻液及解冻液套装铵离子含量（μg/mL）

Tab. 3 Content of ammonium ions in refrigerant kit and thawing fluid kit (μg/mL)

液体类别		套装1	套装2	套装3	套装4	液体类别		套装1	套装2	套装3	套装4
冷冻液套装	平衡液	0.89	1.89	2.34	3.34	解冻液套装	稀释液	0.98	2.17	2.16	4.09
	冷冻液	1.19	1.47	1.46	2.63		洗涤液	0.88	2.47	2.57	4.68
解冻液	解冻液	1.06	1.83	1.84	3.77						

2.4.2 不同储存温度、时间测定结果

ART用液储存温度为2～8 ℃，有效期为6个月，通过老化试验验证货架期内铵离子含量变化情况。试验时间有效期（6个月），取老化因子（Q_{10}）为2（保守值），加速老化温度（T_{AA}）37 ℃，环境温度（T_{RT}）4 ℃（储存温度），计算得到加速老化时间为18 d。

取培养液1适量，分别在37 ℃和4 ℃下储存，监测铵离子含量随时间的变化情况。培养液在37 ℃下储存30 d内铵离子含量大幅增加（第30天时较第0天时增加244.44%）。由于4℃下短时间内培养液中铵离子含量增加缓慢，因此将监测时间延长至240 d，同样可见铵离子含量大幅增加（第240天较第30天增加183.33%）。详见表4。

表4 培养液1中铵离子含量变化情况

Tab. 4 Changes in ammonium ion content in culture fluid 1

温度(℃)	储存时间(d)	含量(μg/mL)	温度(℃)	储存时间(d)	含量(μg/mL)
37	0	0.9	37	30	3.1
37	1	1.1	4	30	0.6
37	3	1.2	4	60	0.9
37	7	1.4	4	90	1.1
37	17	2.3	4	240	1.7

3 讨论

据报道，ART用液中氨（可衍生的铵离子）的来源为不稳定氨基酸和蛋白质[9]。对本研究中液体类产品成分及其含量进行比较，玻璃化冷冻液、解冻液及处理液中人血清白蛋白含量为10～20 mg/mL，远高于其他液体（其他ART用液中蛋白含量约为5 mg/mL，有些处理液中甚至不添加蛋白）。尽管培养液中添加的氨基酸种类最多，覆盖了多种必需及非必需氨基酸，其铵离子浓度在50～84 μmol/L之间，远低于冷冻液、解冻液及处理液。在目前已知铵离子含量的ART用液成分中去掉谷氨酰胺，或用稳定性高的二肽替代后[10]，减少了氨基酸的降解。另外，ART用液产品所用包装材料为以聚对苯二甲酸乙二醇酯共聚物（PETA）生产的塑料瓶，PETA是一种由精对苯二甲酸（PTA）、乙二醇（EG）和1，4－环己烷二甲醇（CHDM）缩聚得到的新型共聚物，不含邻苯二甲酸酯、双酚A和乳胶[11]。从PETA材料的组成成分和结构来看，没有氨的存在，可排除包材对铵离子含量的影响。该试验测定的17批样品统计结果显示，铵离子浓度与人血清白蛋白含量的r为0.943（$n=30$），表明氨的生成量与成分中蛋白含量呈正相关。

动物实验研究表明，氨对胚胎和胎儿的发育会产生不利影响，可浓度依赖性地减少移植后的着床率，抑制胎儿生长[12－14]。在人类胚胎研究中发现，体外受精后ART培养液中铵离子含量增加会降低囊胚发育率[15]，抑制人胚胎代谢，改变基因表达[16]。目前，文献所报道的氨安全阈值并不统一[17－19]，其中最低的为75 μmol/L[5]。从目前的测试结果看，部分液体中铵离子含量已超出限度，但其鼠胚实验结果并未出现异常。因此，对于铵离子安全限量值的制订需继续深入研究。

精子和卵子体外受精后一般在胚胎培养液中培养3～5 d；对于冷冻液、解冻液类产品，它们主要用于冷冻和解冻配子和胚胎，在实际操作中，液体与配子和胚胎短时接触。ART用液中蛋白的作用包括运输激素、生长因子和脂肪酸；重金属螯合；调节pH；清除活性氧（ROS）及保护细胞免受机械损伤等[20]。冻存液类产品主要用于将经过预处理后的配子/胚胎在－196 ℃超低温状态下储存。研究表明，人类卵母细胞在极端降温和升温转变相关的物理和化学应激下，极易受到伤害[21]。添加在冷冻液、解冻液及处理液中的蛋白质，其最主要的作用是为了减少冷冻储存引起的细胞质扰动[22]，保护细胞不受损伤。制订ART用液产品中铵离子的安全限量值时，应充分考虑产品的实际临床使用时间及易降解出铵离子的成分在产品中的作用。

本研究中将胚胎培养液储存于4 ℃条件下，随着时间延长，铵离子含量增多；胚胎培养液储存在37 ℃下，能在短时间内蓄积大量的氨。氨影响胚胎的存活和发育，在设计产品货架期时，应结合氨积累量的数据和风险考虑。根据国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心《无源植入性医疗器械货架有效期注册申报资料指导原则》(2021年修订版)，可通过提高温度验证医疗器械货架有效期，但在ART用液中升高温度会影响其中成分的稳定性，如加快蛋白等成分的降解。因此，升高温度不适于ART用液货架有效期的验证，仍需根据相关产品的性质设计合适的加速降解试验。

综上所述，辅助生殖用医疗器械临床需求的增加及ART的发展，对辅助生殖类医疗器械的安全监管提出了更高要求，即必须加强产品的质量管理。ART用液在我国被作为第三类医疗器械进行管理，为确保产品在货架期内的安全性和有效性，要设计合适的货架有效期验证方法，并对ART用液中有害降解产物安全阈值做进一步研究，加强ART用液的质量控制，提高ART的安全性和成功率。

参考文献

[1] 乔　杰. 人类辅助生殖技术的新进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志，2008，24(1)：33－34.
[2] 章　娜，徐丽明，黄国宁，等. 人类辅助生殖技术用医疗器械的监管和标准现状[J]. 生殖医学杂志，2015，24(7)：591－596.
[3] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局关于发布软性接触镜和人类体外辅助生殖技术用液等2项注册技术审查指导原则的通告(2018年第18号)[A/OL]. (2018－04－25)[2022－02－24]. https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ylqxggtg/ylqxqtggtg/20180426172301719.html.
[4] METHA RH. Growth of human preimplantation embryos *in vitro*[J]. Reprod Biomed Online，2001，2(2)：113－119.
[5] LANE M，GARDNER DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation，metabolism，pH regulation，gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse[J]. Biol Reprod，2003，69(4)：1109－1117.
[6] ZANDER DL，THOMPSON JG，LANE M. Perturbations in mouse embryo development and viability caused by ammonium are more severe after exposure at the cleavage stages [J]. Biology of Reproduction，2006，74(2)：288－294.
[7] 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[S].
[8] YY/T 0995－2015，人类辅助生殖技术用医疗器械术语和定义[S].
[9] SANDER HMK，AAFKE PAVM，OTTO B，et al. Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2－8 ℃ and during incubation at 37 ℃[J]. Hum Reprod，2016，31(6)：1192－1199.
[10] QUINN P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies[J]. Fertil Steril，2004，81(1)：27－29.
[11] 刘洪斌，孙绪江，夏　磊. 改性共聚酯PETG的制备、表征及性能研究[J]. 天津工业大学学报，2007，26(5)：18－21.
[12] LANE M，GARDNER DK. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions[J]. J Reprod Fertil，1994，102(2)：305－312.
[13] GARDNER DK，LANE M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture [J]. Biol Reprod，1993，48(2)：377－385.
[14] HAMMON DS，WANG S，HOLYOAK GR. Effects of ammonia during different stages of culture on development of *in vitro* produced bovine embryos[J]. Anim Reprod Sci，2000，59(1－2)：23－30.
[15] VIRANT－KLUN I，TOMAZEVIC T，VRTACNIK－BOKAL E，et al. Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage [J]. Fertil Steril，2006，85：526－528.
[16] GARDNER DK，HAMILTONL R，MCCALLIEL B，et al. Human and mouse embryonic development，metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient *in vitro*[J]. Reproduction，2013，146(1)：49－61.
[17] GOLCHIN A，ASADPOUR R，ROSHANGAR L，et al. The Effect of Ammonium Chloride Concentration in *In Vitro* Maturation Culture on Ovine Embryo Development[J]. J Reprod Infertil，2016，17(3)：144－150.
[18] YUAN Y，KRISHER RL. Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs[J]. Anim Reprod Sci，2010，117(3－4)：302－307.
[19] TAREQ K，MIAH AG，SALMA U，et al. Effect of amino acids and dipeptides on accumulation of ammonia in the medium during *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes[J]. Reprod Med Biol，2007，6(3)：165－170.
[20] ALI J，SHAHATA MA，AL－NATSHA SD. Formulation of a protein－free medium for human assisted reproduction [J]. Hum Reprod，2000，15(1)：145－156.
[21] DE SANTIS L，CINO I，COTICCHIO G，et al. Objective evaluation of the viability of cryopreserved oocytes[J]. Reprod Biomed Online，2007，15(3)：338－345.
[22] LUCIA DS，STEFANIA AN，GIOVANNI C，et al. Type of protein supplement in cryopreservation solutions impacts on the degree of ultrastructural damage in frozen－thawed human oocytes[J]. Cryobiology，2020，95：143－150.

（收稿日期：2023－02－09；修回日期：2023－12－18）