

LC-MS/MS法测定人尿液中伪人参皂苷GQ浓度的不确定度评定

霍记平^{1*},梅升辉¹,赵志刚¹,李新刚¹,胡蓓²,李平亚³,刘金平³,江骥^{2#}(1.首都医科大学附属北京天坛医院药学部,北京 100050;2.中国医学科学院北京协和医院临床药理研究中心,北京 100730;3.吉林大学再生医学科学研究所新药研究室,长春 130021)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)02-0193-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.02.15

摘要 目的:评定液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定人尿液中伪人参皂苷GQ(PGQ)浓度的不确定度。方法:全面分析LC-MS/MS法测定人尿液中PGQ浓度的整个过程,对测量重复性、标准品称量、工作液配制、生物样品配制、萃取回收过程、仪器允差和标准曲线拟和等引起的不确定度分别进行评定,计算合成不确定度并进行扩展。结果:人尿液中低、中、高(5.59、48.07、744.60 ng/ml)浓度PGQ的扩展不确定度分别为0.58、3.33、50.62($P=95\%$, $k=2$)。结论:LC-MS/MS法测定人尿液中PGQ浓度的不确定度在低浓度时主要由萃取回收率、生物样品制备和测量重复性引入,在中、高浓度时主要由生物样品制备和萃取回收率引入。

关键词 液相色谱串联质谱法;尿液;伪人参皂苷GQ;不确定度

Uncertainty Evaluation for the Determination of Pseudo-ginsenoside GQ in Human Urine by LC-MS/MS

HUO Jiping¹, MEI Shenghui¹, ZHAO Zhigang¹, LI Xingang¹, HU Bei², LI Pingya³, LIU Jinping³, JIANG Ji² (1. Dept. of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 3. New Medicin Research Section, Institute of Regenerative Medicine Science of Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the uncertainty for the determination of pseudo-ginsenoside GQ (PGQ) concentration in human urine by LC-MS/MS. METHODS: The whole process of PGQ determination by LC-MS/MS in human urine was analyzed, and the uncertainty caused by repeatability, weighing, standard solution preparation, biological sample preparation, recovery, instrument precision and calibration curve fitting were evaluated. The combined uncertainty were calculated and expanded. RESULTS: The expanded uncertainty for low, medium, high (5.59, 48.07, 744.60 ng/ml) levels of PGQ in human urine were 0.58, 3.33, 50.62, respectively ($P=95\%$, $k=2$). CONCLUSIONS: The uncertainty of the PGQ determination in human urine by LC-MS/MS is mainly caused by recovery, repeatability of biological sample preparation and determination at low concentration; by sample preparation and recovery at medium and high concentration.

KEYWORDS LC-MS/MS; Urine; Pseudo-ginsenoside GQ; Uncertainty

不确定度是指由于测量误差的存在,对被测量值的准确性造成影响的程度。建立不确定度的评定方法,考察方法中测量不确定度各分量的来源及大小,可提高检测结果之间的可比性,改进试验方案,提高检测质量^[1]。人参皂苷(Ginsenoside)是人参的主要活性成分,对心血管系统、神经系统等多个系统均具有不同程度的保护作用^[2]。伪人参皂苷GQ(pseudo-ginsenoside GQ, PGQ)注射液是最新研制开发的国家一类新药(化学药品1.1类),其主要成分PGQ为奥克梯隆型人参皂苷,是以人参(*Panax Ginseng* C.A.Mayer)中20(S)-人参皂苷Rg3为原料,经过对其侧链进行氧化环合而得到的新化合物^[3-5],目标适应证为心肌缺血以及不稳定性心绞痛,目前仍处于研发阶段。本研究建立了液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定人尿液中PGQ浓度的方法,并根据国家质量技术监督局批准发布的规范和相关指南^[6-9]对该方法的不确定度进行了评定。

1 材料

1.1 仪器

API 4000 三重串联四极杆质谱仪, Shimadzu LC-20AD 液

* 博士。研究方向:药动学及医院药学。电话:010-67096867。E-mail:gaoshan-523@163.com

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:药动学及药物I期临床研究。电话:010-88068357。E-mail:pk.frosh@gmail.com

相色谱系统(日本Shimadzu公司);Mettler AX105DR型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);DB-3D型氮气吹干仪(英国Techne公司);Milli Q型纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

PGQ标准品(吉林华康药业股份有限公司,纯度:98.2%);内标标准品:PGQ结构类似物(吉林华康药业股份有限公司,纯度:98.4%);甲醇为色谱纯,乙酸乙酯和乙酸铵为分析纯,去离子水由Milli Q纯化系统制备。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Poroshell 120 EC C₈(50 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相:甲醇-10 mmol/L 乙酸铵(90:10, V/V);流速:0.3 ml/min;柱温:40℃;进样量:10 μl。

采用电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI),在负离子电离模式下,选用多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM)的质谱扫描方式进行测定;每个MRM通道的扫描时间为200 ms;PGQ和内标标准品的母、子离子对的质荷比(m/z)分别为:799.7→161.1和1 077.8→191.0;其保留时间分别为0.57、0.53 min。

2.2 对照品溶液的配制

准确称取PGQ标准品10.45 mg,使用甲醇定容至10 ml量

瓶中,得质量浓度为1.03 mg/ml的母液。精确吸取母液1 ml,以甲醇定容至10 ml量瓶中,得到100 μg/ml的工作液W。

以甲醇为溶剂,配制质量浓度分别为25、50、100、250、1 000、2 000、5 000、10 000 ng/ml的标准曲线工作液,具体配制过程如下:吸取工作液W 0.5 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到10 μg/ml的工作液W8;吸取工作液W 0.25 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到5 μg/ml的工作液W7;吸取工作液W8 1 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到2 μg/ml的工作液W6;吸取工作液W8 0.5 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到1 μg/ml的工作液W5;吸取工作液W5 1.25 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到250 ng/ml的工作液W4;吸取工作液W5 0.5 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到100 ng/ml的工作液W3;吸取工作液W4 1 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到50 ng/ml的工作液W2;吸取工作液W4 0.5 ml,以甲醇定容至5 ml量瓶中,得到25 ng/ml的工作液W1。

另准确称取内标标准品10.23 mg,定容至10 ml量瓶中,得质量浓度为1.00 mg/ml的母液。向50 ml量瓶中加入1.00 mg/ml母液1.25 ml,使用去离子水定容,得到25 μg/ml内标工作液。

2.3 尿液样本的制备

尿液标准曲线的8个浓度为上述标准曲线工作液8个浓度的1/10,在尿液样本制备时可配制出标准曲线浓度(见“2.3”),即尿液的标准曲线浓度范围为2.5、5、10、25、100、200、500、1 000 ng/ml。

2.4 PGQ的测定

将尿液样品于室温下解冻,混匀10 s,加入25 μg/ml内标工作液20 μl于2 ml EP管中,加入标线曲线工作液30 μl(工作液浓度为尿液标准曲线浓度的10倍;质控样本及临床尿液生物样本均加入相同体积的纯甲醇),加入空白尿液样本300 μl(质控样本及临床尿液生物样本均加入300 μl对应尿液样本),然后加入乙酸乙酯1 200 μl,振荡2 min后,以离心半径为8 cm、转速为13 000 r/min离心10 min。取上层有机相1 000 μl转移至干净的玻璃管中,于40 °C N₂气流下吹干,并用复溶液(甲醇:水=50:50, V/V)200 μl复溶,振荡2 min后,转移至微型过滤器,以离心半径为8 cm、转速为13 000 r/min离心2 min,转移至进样瓶中,进样5 μl测定,记录质量色谱图及化合物的峰面积,采用内标法计算PGQ的浓度。

2.5 样品分析和标准曲线的建立

采用LC-MS/MS法进行检测,检测的离子对:PGQ为m/z 799.7→161.1,内标为m/z 1 077.8→191.0。以PGQ浓度作为x轴,PGQ与内标峰面积比值作为y轴,用最小二乘法进行线性拟合,权重因子取1/x²。质控样品和未知样品同法分析后,计算得PGQ浓度。标准曲线:y=ax+b,a为回归方程的斜率,b为截距。PGQ浓度:x=(y-b)/a。

3 测量不确定度的评定

3.1 测量不确定度的来源

根据试验流程和检测方法,测量不确定度的来源主要有:重复性、称量、工作液配制、生物样品制备、萃取回收过程、仪器允差、标准曲线拟合、对照品纯度、温度和样品不均匀性等因素,详见图1。

3.2 不确定度的评定

3.2.1 温度对测定的影响 实验室温度控制在(20±2)°C,PGQ和内标在相同温度下测定,因此温度引入的测量不确定度可忽略不计。

3.2.2 重复性引起的不确定度(用A类评定程序) 尿液质控

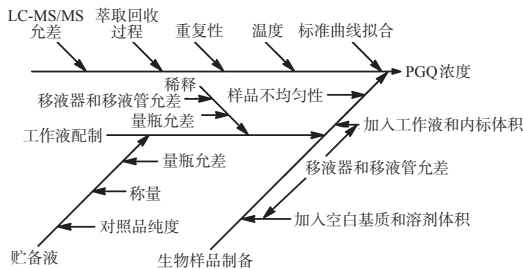


图1 不确定度来源

Fig 1 Causality diagram of uncertainty source

低(L)、中(M)、高(H)浓度(5、50、800 ng/ml)样品共3组(m=3),每组平行测5次(n=5),结果见表1。用贝塞尔公式计算每

组的标准偏差: $S_j(x) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x})^2}{n-1}}$,j为组数,k为每组平行测定次数。计算得 $S_1(x, L) = 0.52$ ng/ml, $S_2(x, L) = 0.77$ ng/ml, $S_3(x, L) = 0.69$ ng/ml,则15次测量的标准偏差: $S(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m S_j^2(x, L)}{m}} = 0.67$ ng/ml

表1 样品重复测定结果($\bar{x} \pm s, n=15, \text{ng/ml}$)

Tab 1 The results of sample determination ($\bar{x} \pm s, n=15, \text{ng/ml}$)

分组	低浓度(5 ng/ml)	中浓度(50 ng/ml)	高浓度(800 ng/ml)
组1	5.54 ± 0.52	47.66 ± 2.21	739.00 ± 44.29
组2	5.57 ± 0.77	49.74 ± 5.60	692.40 ± 34.35
组3	5.65 ± 0.69	46.82 ± 2.42	802.40 ± 53.20

以每组测定结果的平均值表示测量结果,则低浓度平均值的标准偏差为: $S(\bar{x}_L) = S(x, L) / \sqrt{m} = 1.01 / \sqrt{3 \times 5} = 0.17$ ng/ml,低浓度组的均值 $\bar{x}_L = 5.59$ ng/ml,则低浓度质控样品的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(1, L) = u_{\text{rel}}(x, L) = S(\bar{x}_L) / \bar{x}_L = 0.17 / 5.59 = 0.031$$

同法计算中、高浓度组的均值得 $\bar{x}_M = 48.07$ ng/ml, $\bar{x}_H = 744.60$ ng/ml,中、高浓度的相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{\text{rel}}(1, M) = u_{\text{rel}}(x, M) = S(\bar{x}_M) / \bar{x}_M = 0.010$$

$$u_{\text{rel}}(1, H) = u_{\text{rel}}(x, H) = S(\bar{x}_H) / \bar{x}_H = 0.0077$$

3.2.3 天平称量PGQ及内标时引入的测量不确定度(用B类评定程序) 减重法称取PGQ 10.45 mg、内标10.23 mg,称量引起的不确定度为: $u_c(m) = \sqrt{u^2(m) + u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)}$

天平的重复性误差 $u(m)$ 已经在重复性试验中评定,此处不再计算。非线性误差和自动调零引起的不确定度 $u(\Delta)$ 和 $u(\Delta_0)$ 都按均匀分布,包含因子 $k = \sqrt{3}$,天平检定分度值 $e = 0.01$ mg,随机变量半宽 $a = 0.5e$,则标准不确定度为:

$$u(\Delta) = a/k = 0.5e/\sqrt{3} = 0.5 \times 0.01/\sqrt{3} = 0.0029 \text{ mg}$$

自动调零作为一次扣皮,则 $a_0 = a, u(\Delta_0) = a_0/k = u(\Delta) = 0.0029$ mg。天平的标准测量不确定度在不考虑重复性误差时为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = 0.0041 \text{ mg}$$

不考虑重复性误差时,PGQ(W_1)和内标(W_2)的称量相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{\text{rel}}(W_1) = u_c(m) / W_1 = 0.00408 / 10.45 = 0.00039$$

$$u_{\text{rel}}(W_2) = u_c(m) / W_2 = 0.00408 / 10.23 = 0.00040$$

将称量引起的不确定度进行合成,则称量引起的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(W_1) + u_{\text{rel}}^2(W_2)} = 0.00056$$

3.2.4 对照品溶液配制引入的测量不确定度(用B类评定程

序) (1)量瓶引入的测量不确定度。试验所用A级量瓶(F)规格为5、10、50 ml,其最大允差为±0.01 ml、±0.02 ml和±0.05 ml。按三角形分布,包含因子 $k=\sqrt{6}$,则相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(F_{5\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.010/(\sqrt{6} \times 5) = 0.00082$$

$$u_{\text{rel}}(F_{10\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.020/(\sqrt{6} \times 10) = 0.00082$$

$$u_{\text{rel}}(F_{50\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.050/(\sqrt{6} \times 50) = 0.00041$$

(2)移液管引入的测量不确定度。试验所用A级移液管(T)为0.5、1、2 ml,其最大允差分别为±0.005 ml、±0.008 ml和±0.012 ml。按三角形分布,包含因子 $k=\sqrt{6}$,则相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(T_{0.5\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.005/(\sqrt{6} \times 0.5) = 0.0041$$

$$u_{\text{rel}}(T_{1\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.008/(\sqrt{6} \times 1) = 0.0033$$

$$u_{\text{rel}}(T_{2\text{ ml}}) = a/(k\bar{x}) = 0.012/(\sqrt{6} \times 2) = 0.00245$$

(3)加样枪引入的测量不确定度。试验所用Eppendorf加样枪型号有:20~200 μl(P₁)和100~1 000 μl(P₂),P₁在20 μl和100 μl时相对最大允差分别为±2.5%和±0.6%,P₂在500 μl和1 000 μl时相对最大允差分别为±1.0%和±0.6%。按三角形分布,包含因子 $k=\sqrt{6}$,则加样枪的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(P_{1,20}) = a_1/(k\bar{x}) = 0.025 \times \bar{x}/(k\bar{x}) = 0.025/k = 0.010$$

$$u_{\text{rel}}(P_{1,100}) = a_1/(k\bar{x}) = 0.006 \times \bar{x}/(k\bar{x}) = 0.006/k = 0.0024$$

$$u_{\text{rel}}(P_{2,500}) = a_2/(k\bar{x}) = 0.001 \times \bar{x}/(k\bar{x}) = 0.01/k = 0.0041$$

$$u_{\text{rel}}(P_{2,1000}) = a_2/(k\bar{x}) = 0.006 \times \bar{x}/(k\bar{x}) = 0.006/k = 0.0024$$

(4)对照品溶液配制引入的测量不确定度。对照溶液稀释(包括贮备液配制)共使用5 ml量瓶8次,10 ml量瓶2次,0.5 ml移液管5次,1 ml移液管3次,2 ml移液管1次;内标配制使用10 ml量瓶1次,50 ml量瓶1次,2 ml移液管1次,则溶液配制时PGQ和内标的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(3, \text{PGQ})$$

$$= \sqrt{8u_{\text{rel}}^2(F_{5\text{ ml}}) + 2u_{\text{rel}}^2(F_{10\text{ ml}}) + 5u_{\text{rel}}^2(T_{0.5\text{ ml}}) + 3u_{\text{rel}}^2(T_{1\text{ ml}}) + u_{\text{rel}}^2(T_{2\text{ ml}})} = 0.011$$

$$u_{\text{rel}}(3, \text{内标}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(F_{10\text{ ml}}) + u_{\text{rel}}^2(F_{50\text{ ml}}) + u_{\text{rel}}^2(T_{2\text{ ml}})} = 0.0026$$

$$u_{\text{rel}}(3) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(3, \text{TGC}) + u_{\text{rel}}^2(3, \text{内标})} = 0.012$$

(5)含药标准样品和质控样品配制引入的测量不确定度(用B类评定程序)。配制标准含药样品(S)和质控样品(QC)所用加样枪的型号和次数相同:20~200 μl吸取25 μl 1次,30 μl 1次和200 μl 2次,100~1 000 μl吸取500 μl 1次,1 000 μl 2次,则配制标准含药样品时的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(4, S) = u_{\text{rel}}(4, \text{QC})$$

$$= \sqrt{2u_{\text{rel}}^2(P_{1,20}) + 2u_{\text{rel}}^2(P_{1,100}) + u_{\text{rel}}^2(P_{2,500}) + u_{\text{rel}}^2(P_{1,1000})}$$

$$u_{\text{rel}}(4) =$$

$$= \sqrt{2 \times (2 \times 0.010^2 + 2 \times 0.0024^2 + 0.041^2 + 2 \times 0.0024^2)} = 0.022$$

3.2.5 萃取过程(用B类评定程序) 萃取过程引入的不确定度主要考虑回收率(RE)。配制3个浓度的QC,同时用流动相配制与这3个质控浓度相同的样品,回收率=提取样品中的PGQ峰面积(A)/标准溶液中的PGQ峰面积(B),每组平行采样5次(数据见表2),则回收率的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(5, L) = u_{\text{rel}}(\text{RE}, L) = \frac{SD_L}{\text{RE} \% \sqrt{n}} = \frac{3.87}{68.28 \times \sqrt{5}} = 0.025$$

$$u_{\text{rel}}(5, M) = u_{\text{rel}}(\text{RE}, M) = \frac{SD_M}{\text{RE} \% \sqrt{n}} = \frac{1.89}{69.54 \times \sqrt{5}} = 0.012$$

$$u_{\text{rel}}(5, H) = u_{\text{rel}}(\text{RE}, H) = \frac{SD_H}{\text{RE} \% \sqrt{n}} = \frac{1.97}{71.61 \times \sqrt{5}} = 0.012$$

3.2.6 仪器量化引入的测量不确定度 所用质谱为API 4000三重串联四极杆质谱仪,所有液相为SHIMADZU LC-20AD液相色谱系统,质谱仪定量和液相仪吸样的最大允差为3%和

表2 PGQ的萃取回收率($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Extraction recovery of PGQ($\bar{x} \pm s, n=5$)

质控浓度, ng/ml	萃取后峰面积	对照溶液加溶剂峰面积	RE, %
5(L)	2 876.00 ± 61.48	4 220.00 ± 189.34	68.28 ± 3.87
50(M)	24 280.00 ± 683.37	34 920.00 ± 690.65	69.54 ± 1.89
800(H)	371 200.00 ± 9 391.49	518 400.00 ± 6 503.85	71.61 ± 1.97

1%,按均匀分布,则仪器量化的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(6) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2 \text{质谱} + u_{\text{rel}}^2 \text{液相}} = \sqrt{(0.03/\sqrt{3})^2 + (0.01/\sqrt{3})^2} = 0.018$$

3.2.7 线性拟合过程引入的测量不确定度(用B类评定程序) 测定8个不同浓度的对照品尿液,用PGQ峰面积与内标峰面积的比值对PGQ浓度进行线性拟合,PGQ与内标峰面积比见表3;权重因子为 $1/x^2$,得到3条标准曲线,斜率和截距见表4;用拟合的标准曲线计算出对照品尿液中的PGQ质量浓度,结果见表5。

表3 PGQ与内标峰面积比

Tab 3 Peak area ratio of PGQ with the internal standard

浓度, ng/ml	曲线1	曲线2	曲线3
S _{1,2.5}	0.121	0.151	0.192
S _{2,5}	0.249	0.286	0.421
S _{3,10}	0.562	0.656	0.850
S _{4,25}	1.46	1.41	1.69
S _{5,100}	5.10	5.29	6.97
S _{6,200}	9.95	10.5	13.9
S _{7,500}	21.6	26.4	30.0
S _{8,1000}	46.9	51.9	70.1

表4 各拟合标准曲线的参数

Tab 4 Parameters of fitted calibration curves

序号	斜率	截距
曲线1	0.049	0.003
曲线2	0.053	0.020
曲线3	0.068	0.034
均值	0.057	0.019

表5 对照品尿液中PGQ的质量浓度(ng/ml)

Tab 5 Concentration of PGQ in standard urine samples(ng/ml)

浓度, ng/ml	曲线1	曲线2	曲线3
S _{1,2.5}	2.41	2.47	2.32
S _{2,5}	5.00	5.00	5.69
S _{3,10}	11.4	12.0	12.0
S _{4,25}	29.7	26.0	24.4
S _{5,100}	104	99.4	102
S _{6,200}	203	198	204
S _{7,500}	441	498	441
S _{8,1000}	957	979	1 030

对照品尿液每个浓度重复分析的次数为3次, $m=3$,标准曲线有8个浓度点, $n=8$, N 为测定标准尿液溶液的总次数, $N=m \times n=24$; a_m 为标准曲线的斜率; b_m 为标准曲线的截距; \bar{x} 为8个标准尿液浓度的理论平均值, $\bar{x}=230.03$; x_i 为第*i*个标准尿液溶液的浓度; j 为测定尿液标准溶液的序号($j=1,2,3 \dots N$); i 为每组对照溶液的序号。

$$\text{自相关方差为: } S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 2 515 960.89$$

$$\text{残余标准差为: } S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^{mn} [y_j - (a_m x_j + b_m)]^2}{N-2}} = 0.0094$$

测定低、中、高浓度质控样品各15次, $P=15$, 计算得到平均浓度分别为 $\bar{x}_L=5.59$ ng/ml, $\bar{x}_M=48.07$ ng/ml, $\bar{x}_H=744.60$ ng/ml, $\bar{a}=0.057$, 则曲线拟合的标准测量不确定度为:

$$u(x_L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \\ = \frac{0.0094}{0.057} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{24} + \frac{(5.59 - 230.03)^2}{2515960.89}} = 0.020$$

$$u(x_M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \\ = \frac{0.0094}{0.057} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{24} + \frac{(48.07 - 230.03)^2}{2515960.89}} = 0.013$$

$$u(x_H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \\ = \frac{0.0094}{0.057} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{24} + \frac{(744.60 - 230.03)^2}{2515960.89}} = 0.105$$

则曲线拟合的相对标准测量不确定度为:

$$u_{rel}(7, L) = u_{rel}(x_L) = \frac{u(x_L)}{\bar{x}_L} = 0.020/5.59 = 0.011$$

$$u_{rel}(7, M) = u_{rel}(x_M) = \frac{u(x_M)}{\bar{x}_M} = 0.013/48.07 = 0.0012$$

$$u_{rel}(7, H) = u_{rel}(x_H) = \frac{u(x_H)}{\bar{x}_H} = 0.105/744.60 = 0.00010$$

3.2.8 样品不均匀性引入的测量不确定度 样品均为液态, 使用前充分混合, 则由样品不均匀性引入的不确定度可忽略不计。

3.2.9 对照品纯度引入的测量不确定度 对照品未提供不确定度, 视为真实值, 则引入的不确定度视为零。

3.3 标准测量不确定度的合成

依据不确定度传播规律对各相对标准测量不确定度进行合成:

$$u_{c,rel} = \sqrt{u_{rel}^2(1) + u_{rel}^2(2) + u_{rel}^2(3) + u_{rel}^2(4) + u_{rel}^2(5) + u_{rel}^2(6) + u_{rel}^2(7)}$$

则PGQ质控样品的合成相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{c,rel}(L) = \sqrt{0.031^2 + 0.00056^2 + 0.012^2 + 0.022^2 + 0.025^2 + 0.018^2 + 0.011^2} \\ = 0.0515$$

$$u_{c,rel}(M) = \sqrt{0.010^2 + 0.00056^2 + 0.012^2 + 0.022^2 + 0.012^2 + 0.018^2 + 0.0012^2} \\ = 0.035$$

$$u_{c,rel}(H) = \sqrt{0.0077^2 + 0.00056^2 + 0.012^2 + 0.022^2 + 0.012^2 + 0.018^2 + 0.00010^2} \\ = 0.034$$

PGQ质控样品的合成标准测量不确定度分别为:

$$u_c(L) = u_{c,rel}(L) \times \bar{x}_L = 0.0515 \times 5.59 = 0.29$$

$$u_c(M) = u_{c,rel}(M) \times \bar{x}_M = 0.035 \times 48.07 = 1.66$$

$$u_c(H) = u_{c,rel}(H) \times \bar{x}_H = 0.034 \times 744.60 = 25.31$$

3.4 标准测量不确定度的扩展

用简易评定法, 对应的置信概率 $P=95\%$ ($k=2$), 则扩展不确定度分别为:

$$U_L = k \times u_c(L) = 0.58$$

$$U_M = k \times u_c(M) = 3.33$$

$$U_H = k \times u_c(H) = 50.62$$

3.5 测定结果的表示

当置信概率 $P=95\%$ ($k=2$), 尿液中PGQ低、中、高浓度质控的测定结果可以分别表示为 (5.59 ± 0.58) 、 (48.07 ± 3.33) 、 (744.60 ± 50.62) ng/ml。

4 讨论

本文评价了采用LC-MS/MS分析方法测定人尿液中PGQ浓度的不确定度, 按照试验流程寻找不确定度的来源并量

化。根据文献[9]报道, 其不确定度可估计为正态分布 ($k=2$, $P=95\%$)。对于低浓度质控样品来说, 回收率对不确定度的贡献最大, 其次为生物样品配制和重复性; 中、高浓度样品的不确定度来源主要由生物样品配制和回收率构成, 这提示要关注样品配制过程以及萃取过程的均一性, 以提高样品检测的准确度。不确定度分量的统计直方图见图2。

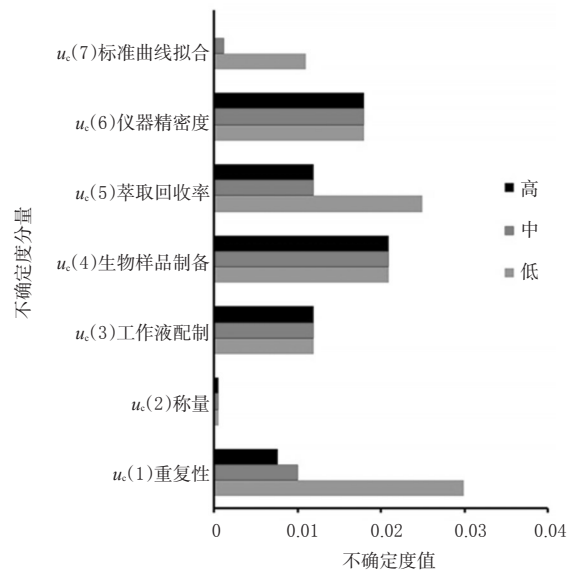


图2 不确定度分量的统计直方图

Fig 2 Statistic histogram of components of uncertainty

总之, 生物样品的药物浓度分析过程较为复杂, 受到的干扰因素较多, 通过对分析测定过程中误差的来源及大小进行分析, 便于优化方法和改进检测方案, 可使检测结果更准确可靠。为了实现临床血药浓度监测的标准化, 提高检测结果的质量, 对测定方法进行不确定度的评定将变得更加必要。

参考文献

- [1] 王佳庆, 朱乐亭, 杨莉, 等. HPLC法测定血浆中万古霉素浓度的不确定度评定[J]. 药品评价, 2013, 10(20): 31.
- [2] 霍记平, 黄凯, 李新刚, 等. 人参皂苷对心血管疾病的药理作用和药代动力学特征[J]. 药品评价, 2014, 11(18): 11.
- [3] 赵春芳, 刘金平, 赵岩, 等. 伪人参皂苷GQ的排泄试验研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 432.
- [4] 李平靖, 张婷, 王晓莹, 等. 伪人参皂苷GQ对力竭运动小鼠抗疲劳作用研究[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(7): 869.
- [5] 刘金平, 赵春芳, 李平亚, 等. 伪人参皂苷GQ对异丙肾上腺素致大鼠急性心肌缺血的改善作用[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2006, 32(1): 64.
- [6] 施昌彦, 刘风, 王一铭, 等. 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2000: 101-109.
- [7] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999: 测量不确定度评定与表示[S]. 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [8] CNAS-CL01. Accreditation criteria for the competence of testing and calibration laboratories[S]. 2006: 18.
- [9] 张肖宁, 侯勇生, 霍东风. HPLC法测定兔眼房水中黄芩苷浓度的不确定度评定[J]. 中国药房, 2012, 23(31): 2884.

(收稿日期: 2015-04-01 修回日期: 2015-12-14)

(编辑: 李 劲)