

HPLC-MS/MS 法测定人血浆伪人参皂苷 GQ 浓度的不确定度评定

霍记平¹, 梅升辉¹, 赵志刚¹, 王洪允², 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理学部, 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)

摘要 目的 评估高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS/MS) 测定人血浆伪人参皂苷 GQ (PGQ) 浓度的不确定度。方法 全面分析 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中 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 人血浆低浓度 ($15.16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)、中浓度 ($2\,516.67 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和高浓度 ($3\,902.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) PGQ 的扩展不确定度分别为 1.39, 177.74 和 $262.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P=95\%$, $k=2$)。结论 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中 PGQ 浓度的不确定度在低浓度时主要由萃取回收率、生物样品配制和测量重复性引入, 在中浓度和高浓度时主要由生物样品配制和萃取回收率引入。

关键词 伪人参皂苷 GQ; 高效液相色谱-质谱联用法; 不确定度

中图分类号 R286; R927.1

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)03-0262-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.03.007

Uncertainty Evaluation for the Determination of Pseudo-ginsenoside GQ in Human Plasma by HPLC-MS/MS

HUO Jiping¹, MEI Shenghui¹, ZHAO Zhigang¹, WANG Hongyun², HU Pei², LI Pingya³, LIU Jinping³, JIANG Ji² (1. Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Clinical Pharmacology Research Center, Peking Union Medical Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 3. Institute of Frontier Medical Science of Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective To evaluate the uncertainty of the pseudo-ginsenoside GQ (PGQ) concentration in human plasma by HPLC-MS/MS. **Methods** The whole process of PGQ determination by HPLC-MS/MS in human plasma was evaluated and the uncertainty caused by repeatability, weighing, standard solution preparation, biological sample preparation, extraction recovery process, recovery, instrument precision and calibration curve fitting were evaluated, respectively. The combined and expanded uncertainty values were both calculated. **Results** The expanded uncertainty values for low ($15.16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), medium ($2\,516.67 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) and high ($3\,902.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) levels of PGQ were 1.39, 177.74 and $262.69 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively ($P=95\%$, $k=2$). **Conclusion** The uncertainty of the PGQ determination in human plasma by HPLC-MS/MS is mainly caused by recovery, repeatability and sample preparation at low concentration, by sample preparation and recovery at medium and high concentration.

KEY WORDS Pseudo-ginsenoside GQ; HPLC-MS/MS; 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, 通过考察方法中测量不确定度各分量的来源及大

小, 不仅可提高检测结果之间的可比性, 更重要的是还可以改进实验方案, 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、免疫系统和生殖系统等方面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, 是以人参中 20(S)-人参皂苷 Rg_3 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], 是针对心肌缺血以及不稳定性心绞痛的一种单体创新药物, 目前仍处于研发阶

收稿日期 2015-12-01 修回日期 2016-01-22

作者简介 霍记平 (1983-), 女, 河北保定人, 药师, 博士, 主要从事药代动力学及医院药学工作。电话: 010-67096867, E-mail: gaoshan-523@163.com。

通信作者 江骥 (1954-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事药动力学及药物 I 期临床研究工作。电话: 010-88068357, E-mail: pk.frosh@gmail.com。

段。笔者在本研究建立 HPLC-MS/MS 法测定人血浆中 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^[6-8]对该方法的不确定度进行评定。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 API 4000 三重串联四极杆质谱仪, SHIMADZU LC-20AD 液相色谱系统, Mettler AX105DR 型电子天平, DB-3D 型氮气吹干仪, Milli Q 型纯水机。

1.2 试剂 PGQ (含量:98.2%,由吉林华康药业股份有限公司提供),内标为 PGQ 结构类似物人参皂苷 Rc (含量:98.4%,由吉林华康药业股份有限公司提供),色谱纯甲醇购自 Burdick & Jackson 公司(HPLC 级,批号:AH230-4),乙酸乙酯(分析纯,纯度:98.0%,批号:9282-03)和乙酸铵(分析纯,含量:98.0%,批号:20080126)购自北京化学试剂公司,去离子水由 Milli Q 纯化系统制备。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件 色谱柱使用 Agilent 公司的 Poroshell 120 EC C₈ (2.1 mm × 50 mm, 2.7 μm) 色谱柱,液相分离采用等度洗脱,每一个样品分析用时 2 min,流动相:甲醇-10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵 = (9:1);流速 0.3 mL·min⁻¹;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 Rc (内标)的母、子离子对的质荷比分别为: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 取 PGQ 对照品 10.45 mg 精密称定,以甲醇定容到 10 mL 量瓶,得到 1.00 mg·mL⁻¹ 标准品母液。准确吸取母液 2.45 mL 到 5 mL 量瓶,甲醇定容得 500 μg·mL⁻¹ 标准曲线工作液 W。

取 PGQ 对照品 10.40 mg 精密称定,使用甲醇定容到 10 mL 量瓶,得 1.00 mg·mL⁻¹ 质控母液。分别准确吸取 1.96, 1.22 mL PGQ 质控母液转移至 5 mL 量瓶,以甲醇定容至刻度,得到 400 μg·mL⁻¹ 质控工作液 W1 和 250 μg·mL⁻¹ 质控工作液 W2。

精密称量内标 10.23 mg 于 10 mL 量瓶,甲醇定容得 1.00 mg·mL⁻¹ 内标储备液;移液管量取储备液 4.95 mL 到 50 mL 量瓶,超纯水定容得 100 μg·mL⁻¹ 内标工作液。

2.3 血浆标准曲线和质控样品的配制

2.3.1 血浆标准曲线样品的配制 空白血浆来源于

北京协和医院临床药理研究中心的志愿者。准确吸取工作液 W 0.1 mL 到 10 mL 量瓶,血浆定容得 5 000 ng·mL⁻¹ S8;取 S8 溶液 2 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S7;取 S8 溶液 1 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S6;取 S8 溶液 0.5 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S5;取 S6 溶液 0.5 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S4;取 S5 溶液 0.5 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S3;取 S4 溶液 0.5 mL 定容到 5 mL 量瓶得 S2;取 S3 溶液 1 mL 定容到 10 mL 量瓶得 S1。血浆标准曲线 S1~S8 的浓度分别为 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 2 000, 5 000 ng·mL⁻¹。将血浆的标准曲线样品进行分装,冻存于 -80℃ 冰箱。

2.3.2 质控样品的配制 准确吸取质控工作液 W1 0.1 mL 到 10 mL 量瓶,血浆定容得 4 000 ng·mL⁻¹ 血浆质控 Q3;准确吸取工作液 W2 0.1 mL 到 10 mL 量瓶,血浆定容得 2 500 ng·mL⁻¹ 血浆质控 Q2;准确吸取 Q2 1 mL 到 10 mL 量瓶,血浆定容得 250 ng·mL⁻¹ 血浆溶液,然后从中吸取 0.6 mL 到 10 mL 量瓶,血浆定容得 15 ng·mL⁻¹ 血浆质控 Q1。

2.4 血浆样品和质控样品的制备

2.4.1 血浆样品的制备 将血浆样品于室温下解冻,混匀 10 s。加入 25 μL 内标工作液(100 μg·mL⁻¹,去离子水溶解)于 1.5 mL EP 管中,加入血浆 100 μL,涡旋振荡 30 s,加入乙酸乙酯 600 μL,混匀振荡 2 min 后,13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。取上层有机相 500 μL 转移至干净玻璃试管,于 40 ℃ 氮气(N₂)气流下吹干,并用复溶液(甲醇/水 = 50/50) 100 μL 复溶,振荡 2 min,微型过滤器过滤,10 μL 进样测定,记录质量色谱图及化合物的峰面积,采用内标法计算 PGQ 浓度。

2.4.2 质控样品的制备 质控样品浓度分别为 15, 2 500 和 4 000 ng·mL⁻¹,制备方法同“2.3.1”项。

2.5 样品的分析和标准曲线的建立 采用 LC-MS/MS 法进行检测,检测离子对为: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,以 PGQ 与内标峰面积比值作为 Y 轴,用最小二乘法进行线性拟和,权重因子取 $1/x^2$ 。质控样品和未知样品同法分析后,计算得 PGQ 浓度。

2.6 数学模型的建立 标准曲线: $y = ax + b$, x 为 PGQ 浓度, y 为 PGQ 与内标峰面积之比, 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 根据实验流程和检测方法,测量不确定度的来源主要包括重复性、称量、工作液配制、样品制备、萃取过程、仪器允差、曲线拟合、对照品纯度、温度和样品不均匀性等因素(图 1)。

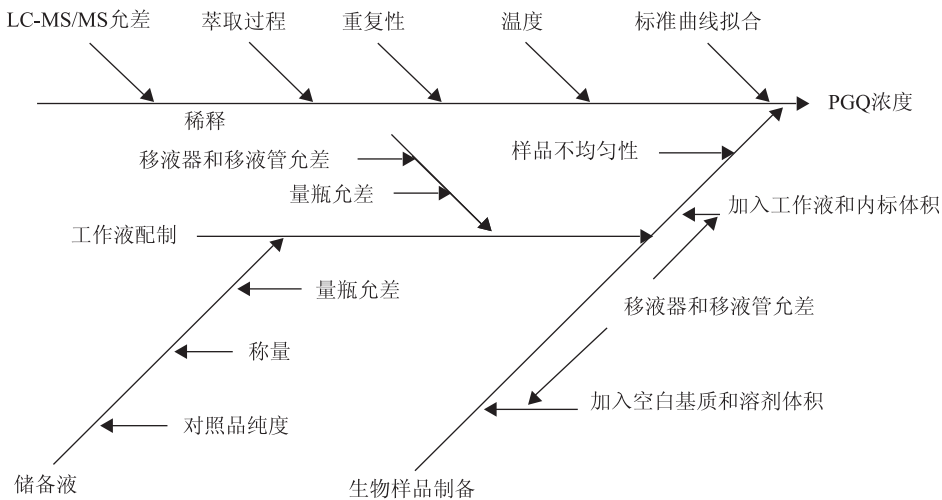


图 1 不确定度来源

Fig.1 Causality diagram of uncertainty source

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 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, PGQ 和内标在相同温度下测定, 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) 血浆质控低浓度 $15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (L), 中浓度 $2\,500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (M) 和高浓度 $4\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (H) 样品共 3 组 ($m=3$), 每组平行测 5 次 ($n=5$), 见表 1。用贝塞尔公式计算每组的标准偏差: $S_j(x) = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x})^2 / (n-1)}$, j 为组数, k 为每组平行测定次数。计算得 $S_1(x, L) = 0.94\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $S_2(x, L) = 1.32\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $S_3(x, L) = 0.64\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 则 15 次测量的标准偏差:

$$S(x, L) = \sqrt{\sum_{j=1}^m S_j^2(x, L) / m} = 1.01\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}。$$

表 1 样品重复测定数据

sample	$\bar{x} \pm s, n=15$		
	$15\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$2\,500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	$4\,000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
组 1	14.98 ± 0.94	$2\,622.00 \pm 129.50$	$4\,220.00 \pm 77.14$
组 2	15.52 ± 1.32	$2\,398.00 \pm 97.06$	$3\,764.00 \pm 50.30$
组 3	14.98 ± 0.64	$2\,530.00 \pm 82.76$	$3\,722.00 \pm 173.12$

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: $S(\bar{x}_L) = S(x, L) / \sqrt{mn} = 1.01 / \sqrt{3 \times 5} = 0.26\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 低浓度组均值 $\bar{x}_L = 15.16\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 则低浓度质控样品相对标准测量不确定度为: $u_{\text{rel}}(1, L) = u_{\text{rel}}(x, L) = S(\bar{x}_L) / \bar{x}_L = 0.26 / 15.16$

$= 0.017$ 。

计算得 $\bar{x}_M = 2\,516.67\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $\bar{x}_H = 3\,902.00\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同法计算中、高浓度相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{\text{rel}}(1, M) = u_{\text{rel}}(x, M) = S(\bar{x}_M) / \bar{x}_M = 0.005\,4$$

$$u_{\text{rel}}(1, H) = u_{\text{rel}}(x, H) = S(\bar{x}_H) / \bar{x}_H = 0.003\,75$$

3.2.2 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 $u(m)$ 已经在重复性实验中评定, 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 $e = 0.01\text{ mg}$, 随机变量半宽 $a = 0.5e$, 则标准不确定度为:

$$u(\Delta) = a/k = 0.5e/\sqrt{3} = 0.5 \times 0.01/\sqrt{3} = 0.002\,9\text{ mg}。$$

自动调零作为一次扣皮, 则 $a_0 = a$, $u(\Delta_0) = a_0/k = u(\Delta) = 0.002\,9\text{ mg}$ 。天平的标准测量不确定度在不考虑重复性误差时为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = 0.004\,1\text{ mg}。$$

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:

$$u_{\text{rel}}(W_1) = u_c(m) / \bar{W}_1 = 0.004\,1 / 10.45 = 0.000\,39, u_{\text{rel}}(W_2) = u_c(m) / \bar{W}_2 = 0.004\,1 / 10.23 = 0.000\,40。$$

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:

$$u_{\text{rel}}(2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(W_1) + u_{\text{rel}}^2(W_2)} = 0.000\,56。$$

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 实验所用 A 级量瓶(F)规格为 5,10 和 50 mL,其最大允差为 ± 0.01 , ± 0.02 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:

$$u_{\text{rel}}(F_{5\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.010/(\sqrt{6} \times 5) = 0.000\ 82$$
$$u_{\text{rel}}(F_{10\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.020/(\sqrt{6} \times 10) = 0.000\ 82$$
$$u_{\text{rel}}(F_{50\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.050/(\sqrt{6} \times 50) = 0.000\ 41$$

②移液管引入的测量不确定度 实验所用 A 级移液管(T)为 0.1,0.5,1,2 和 5 mL,其最大允差分别为 ± 0.002 , ± 0.005 , ± 0.008 , ± 0.012 和 ± 0.025 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:

$$u_{\text{rel}}(T_{0.1\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.002/(\sqrt{6} \times 0.1) = 0.008\ 2$$
$$u_{\text{rel}}(T_{0.5\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.005/(\sqrt{6} \times 0.5) = 0.004\ 08$$
$$u_{\text{rel}}(T_{1\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.008/(\sqrt{6} \times 1) = 0.003\ 3$$
$$u_{\text{rel}}(T_{2\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.012/(\sqrt{6} \times 2) = 0.002\ 45$$

$$u_{\text{rel}}(3,\text{PGQ}) = \sqrt{7u_{\text{rel}}^2(F_{5\text{ mL}}) + 3u_{\text{rel}}^2(F_{10\text{ mL}}) + u_{\text{rel}}^2(T_{0.1\text{ mL}}) + 4u_{\text{rel}}^2(T_{0.5\text{ mL}}) + 2u_{\text{rel}}^2(T_{1\text{ mL}}) + u_{\text{rel}}^2(T_{2\text{ mL}}) + u_{\text{rel}}^2(T_{5\text{ mL}})} = 0.010$$
$$u_{\text{rel}}^2(3,\text{IS}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(F_{10\text{ mL}}) + u_{\text{rel}}^2(F_{50\text{ mL}}) + u_{\text{rel}}^2(F_{5\text{ mL}})} = 0.002\ 2$$
$$u_{\text{rel}}(3) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(3,\text{TGC}) + u_{\text{rel}}^2(3,\text{IS})} = \sqrt{0.010^2 + 0.0022^2} = 0.010\ 5$$

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 次和 100 μL 2 次,100~1 000 μL 吸取 500 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:

$$u_{\text{rel}}(4,\text{S}) = u_{\text{rel}}(4,\text{QC}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2P_{1-20} + 2u_{\text{rel}}^2P_{1-100} + 2u_{\text{rel}}^2P_2}$$
$$u_{\text{rel}}(4) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(4,\text{S}) + u_{\text{rel}}^2(4,\text{QC})} = \sqrt{2 \times (0.010^2 + 2 \times 0.004\ 1^2 + 2 \times 0.004\ 1^2)} = 0.018\ 5$$

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 个浓度质控样品。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,则回收率的相对标准测量不确定度为(数据见表 2):

$$u_{\text{rel}}(5,\text{L}) = u_{\text{rel}}(\text{RE},\text{L}) = \frac{\text{SD}_{\text{L}}}{\text{RE}\%_{\text{L}}\sqrt{n}} = \frac{0.65}{9.17 \times \sqrt{5}} = 0.032$$

$$u_{\text{rel}}(T_{5\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.025/(\sqrt{6} \times 5) = 0.002\ 0$$

$$u_{\text{rel}}(T_{0.1\text{ mL}}) = a/(k\bar{x}) = 0.002/(\sqrt{6} \times 0.1) = 0.008\ 2$$

③加样枪引入的测量不确定度 实验所用 Eppendorf 加样枪型号有:20~200 μL (P_1) 和 100~1 000 μL (P_2), P_1 在 20 和 100 μL 时相对最大允差分别为 $\pm 2.5\%$ 和 $\pm 1.0\%$, P_2 在 500 μL 时相对最大允差为 $\pm 1.0\%$ 。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:

$$u_{\text{rel}}(P_{1-20}) = a_1/(k\bar{x}) = 0.025 \times \bar{x}/(\sqrt{6}\bar{x}) = 0.025/k = 0.010$$
$$u_{\text{rel}}(P_{1-100}) = a_1/(k\bar{x}) = 0.01 \times \bar{x}/(\sqrt{6}\bar{x}) = 0.010/k = 0.004\ 1$$
$$u_{\text{rel}}(P_2) = a_2/(k\bar{x}) = 0.01 \times \bar{x}/(\sqrt{6}\bar{x}) = 0.010/k = 0.004\ 1$$

④对照品溶液配制引入的测量不确定度 对照溶液稀释(包括储备液配制)共使用 5 mL 量瓶 7 次,10 mL 量瓶 3 次,0.1 mL 移液管 1 次,0.5 mL 移液管 4 次,1 mL 移液管 2 次,2 mL 移液管 1 次,5 mL 移液管 1 次;内标配制使用 10 mL 量瓶 1 次,50 mL 量瓶 1 次,5 mL 移液管 1 次,则溶液配制时 PGQ 和内标(IS)的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(5,\text{M}) = u_{\text{rel}}(\text{RE},\text{M}) = \frac{\text{SD}_{\text{M}}}{\text{RE}\%_{\text{M}}\sqrt{n}} = \frac{0.49}{10.30 \times \sqrt{5}} = 0.021$$
$$u_{\text{rel}}(5,\text{H}) = u_{\text{rel}}(\text{RE},\text{H}) = \frac{\text{SD}_{\text{H}}}{\text{RE}\%_{\text{H}}\sqrt{n}} = \frac{0.46}{11.09 \times \sqrt{5}} = 0.018\ 5$$

表 2 PGQ 的萃取回收率			
Tab.2 Extraction recovery of PGQ		$\bar{x} \pm s, n = 5$	
质控浓度/ (ng·mL ⁻¹)	萃取后峰 面积(A)	对照溶液加溶 剂峰面积(B)	回收率 RE/%
15(L)	736.20 ± 46.06	8 036.00 ± 108.31	9.17 ± 0.65
2 500(M)	119 800.00 ± 4 381.78	1 164 000.00 ± 30 495.90	10.30 ± 0.49
4 000(H)	197 000.00 ± 7 314.37	1 776 000.00 ± 27 018.51	11.09 ± 0.46

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 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 个不同浓度对照品血浆,用 PGQ 峰面积与内标峰面积的比值对 PGQ 浓度进行线性拟合(表 3),权重因子为 $1/x^2$,得到 5 条标准曲线(CC),斜率和截距见表 4,用拟合的标准曲线反算出对照品血浆的 PGQ 浓度(表 5)。

表 3 PGQ 与内标峰面积比

Tab.3 Area ratio of PGQ with the internal standard

浓度/(ng·mL ⁻¹)	曲线 1	曲线 2	曲线 3	曲线 4	曲线 5
S1,5	0.013 0	0.013 0	0.013 7	0.012 3	0.011 0
S2,10	0.026 8	0.028 2	0.022 4	0.017 1	0.016 2
S3,50	0.106	0.120	0.113	0.126	0.111
S4,100	0.199	0.219	0.206	0.215	0.209
S5,500	0.980	1.07	0.990	0.980	1.02
S6,1 000	1.99	2.14	2.09	2.11	1.99
S7,2 000	4.12	3.86	4.37	4.16	3.88
S8,5 000	10.43	10.22	10.08	9.84	9.52

表 4 各拟合标准曲线的参数

Tab.4 Parameters of the calibration curves

序号	斜率	截距
曲线 1	0.002 04	0.003 52
曲线 2	0.002 12	0.002 55
曲线 3	0.002 07	0.003 10
曲线 4	0.002 05	0.002 06
曲线 5	0.002 02	0.001 03
均值	0.002 06	0.002 45

表 5 拟合曲线计算出各对照品血浆的浓度结果

Tab.5 Back-calculated concentration of PGQ in standard plasma samples

浓度/(ng·mL ⁻¹)	曲线 1	曲线 2	曲线 3	曲线 4	曲线 5
S1,5	4.65	4.93	5.12	5.00	4.94
S2,10	11.4	12.1	9.32	7.34	7.51
S3,50	50.2	55.4	53.1	60.5	54.4
S4,100	95.8	102	98.0	104	103
S5,500	479	504	477	477	504
S6,1 000	974	1 008	1 008	1 028	985
S7,2 000	2 018	1 820	2 110	2 028	1 920
S8,5 000	5 111	4 820	4 868	4 799	4 712

对照品血浆每个浓度重复分析 5 次, $m=5$,标准曲线有 8 个浓度点, $n=8$, N 为测定标准血浆溶液的总次数, $N=m \times n=40$; a_m 为标准曲线的斜率; b_m 为标准曲线的截距; \bar{x} 为 8 个标准血浆浓度的理论平均值, $\bar{x}_i=1\,145.625$; x_i 为第 i 个标准血浆溶液的浓度; j 为测定血浆标准溶液的序数($j=1,2,3 \cdots N$); i 为每组对照溶液的序数。

自相关方差为: $S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_i - \bar{x})^2 = 99\,311\,172.45$ 。

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

0.000 45。

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 $\bar{x}_L = 15.16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x}_M = 2\,516.67 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x}_H = 3\,902.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{a} = 0.002\,06$, 则曲线拟合的标准测量不确定度为:

$$u(x_L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} =$$

$$\frac{0.000\,45}{0.002\,06} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{40} + \frac{(15.16 - 1\,145.625)^2}{99\,311\,172.45}} = 0.071$$

$$u(x_M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} =$$

$$\frac{0.000\,45}{0.002\,06} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{40} + \frac{(2\,516.67 - 1\,145.625)^2}{99\,311\,172.45}} = 0.073$$

$$u(x_H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} =$$

$$\frac{0.000\,45}{0.002\,06} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{40} + \frac{(3\,902.00 - 1\,145.625)^2}{99\,311\,172.45}} = 0.090$$

则曲线拟合的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(7, L) = u_{\text{rel}}(x_L) = \frac{u(x_L)}{\bar{x}_L} = 0.071/15.16 = 0.004\,7$$

$$u_{\text{rel}}(7, M) = u_{\text{rel}}(x_M) = \frac{u(x_M)}{\bar{x}_M} =$$

$$0.073/2\,516.67 = 0.000\,029$$

$$u_{\text{rel}}(7, H) = u_{\text{rel}}(x_H) = \frac{u(x_H)}{\bar{x}_H} =$$

$$0.090/3\,902.00 = 0.000\,023$$

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。

4 标准测量不确定度的合成及扩展

4.1 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:

$$u_{c,rel}(L) = \sqrt{0.017^2 + 0.000\ 56^2 + 0.010\ 5^2 + 0.018\ 5^2 + 0.032^2 + 0.018^2 + 0.004\ 7^2} = 0.046$$

$$u_{c,rel}(M) = \sqrt{0.005\ 4^2 + 0.000\ 56^2 + 0.010\ 5^2 + 0.018\ 5^2 + 0.021^2 + 0.018^2 + 0.000\ 029^2} = 0.035$$

$$u_{c,rel}(H) = \sqrt{0.003\ 75^2 + 0.000\ 56^2 + 0.010\ 5^2 + 0.018\ 5^2 + 0.018\ 5^2 + 0.018\ 5^2 + 0.018^2 + 0.000\ 023^2} = 0.034$$

PGQ 质控样品的合成标准测量不确定度分别为:

$$u_c(L) = u_{c,rel}(L) \times \bar{x}_L = 0.046 \times 15.16 = 0.70$$

$$u_c(M) = u_{c,rel}(M) \times \bar{x}_M = 0.035 \times 2\ 516.67 = 88.87$$

$$u_c(H) = u_{c,rel}(H) \times \bar{x}_H = 0.034 \times 3\ 902.00 = 131.345$$

4.2 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:

$$U_L = k \times u_c(L) = 1.39$$

$$U_M = k \times u_c(M) = 177.74$$

$$U_H = k \times u_c(H) = 262.69$$

5 测定结果的表示

当置信概率 $P = 95\%$ ($k = 2$),血浆中 PGQ 低、中、高浓度质控的测定结果分别表示为 (15.16 ± 1.39) , $(2\ 516.67 \pm 177.74)$ 和 $(3\ 902.00 \pm 262.69)$ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

6 讨论

笔者评价了采用 HPLC-MS/MS 分析方法测定血浆 PGQ 浓度的不确定度,按照实验流程寻找不确定度的来源并进行了量化。根据文献报道,其不确定度可估计为正态分布 ($k = 2, P = 95\%$)^[9]。对于低浓度样品,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分量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。

生物样品的药物浓度分析过程较复杂,环境、人员、仪器、量具等都会对检验结果带来一定不准确因素^[10],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,使检测结果更准确可靠,提高检测结果的质量。

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): 31-35.
- [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):11-15.
- [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):432-435.
- [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):869-871.
- [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):64-67.
- [6] 施昌彦,刘凤,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指南[S]. 北京:中国计量出版社,2005.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01. 检测和校准实验室能力认可准则[S]. 北京,2006.
- [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):2884-2887.
- [10] 林远凤,黄燕萍. 高效液相色谱法测定三黄片中盐酸小檗碱含量的不确定度分析[J]. 医药导报,2011,30(1):106-108.