

LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的不确定度评定

杨 瑞, 董晓茜, 唐 思, 张世良, 靖博宇, 夏素霞, 李国信*

辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 10034

摘 要: 目的 评定 LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的不确定度。方法 对 LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的全过程进行分析, 建立数学模型, 确定影响不确定度的因素并对各个因素进行评估, 计算合成不确定度及扩展不确定度。结果 置信概率 P 为 95% 时, 血浆中低、中、高 (0.61、12.26、245.20 $\mu\text{g/L}$) 浓度五味子醇甲的扩展不确定度分别为 1.08、1.76、27.00 $\mu\text{g/L}$ 。结论 本方法适用于 LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的不确定度评定, 不确定度主要由线性回归过程引入。

关键词: 五味子醇甲; LC-MS 法; 血浆; 不确定度; 扩展不确定度

中图分类号: R 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2015)01-0061-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.01.12

Uncertainty evaluation on determination of schisandrin in human plasma by LC-MS

YANG Rui, DONG Xiao-qian, TANG Si, ZHANG Shi-liang, JING Bo-yu, XIA Su-xia, LI Guo-xin

Academe of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province, Shenyang Liaoning 110034

Abstract: **Objective** To evaluate the uncertainty in determination of schisandrin in human plasma by LC-MS. **Methods** The uncertainty caused by various factors in the whole process of determination was analyzed. Mathematical model was established. Influential factors of uncertainty were identified and evaluated. The combined uncertainty was calculated and the expanded uncertainty was obtained. **Results** The expanded uncertainty for the low, medium and high levels (0.61, 12.26, and 245.20 $\mu\text{g/L}$) of schisandrin was 1.08, 1.76, and 27.00 $\mu\text{g/L}$, respectively ($P = 95\%$). **Conclusion** This method is applicable to the uncertainty evaluation of schisandrin determination in human plasma, and the uncertainty of this method was mainly caused by linear regression.

Key words: schisandrin; LC-MS; plasma; uncertainty; expanded uncertainty

测量不确定度是与测量结果相关联的一个参数, 用以表征合理地赋予被测量值的分散性。建立测量不确定度的评定方法, 既是提高检测质量的需要, 也是实现检测数据国际互认所不可缺少的内容。五味子中主要活性成分为木脂素, 具有保肝护肝、镇静催眠、抗病毒、抗肿瘤及抗炎作用, 五味子醇甲^[1]为木脂素的一种。本文建立了 LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的浓度, 但由于生物样品成分复杂多样、生物样本处理过程繁琐, 引起不确定度的分量较多, 不确定度评定较为困难。目前尚未见其不确定度评定的报道。本文根据国家质量技术监督局批准发布的 JJF1059.1-2012 计量技术规范

《测量不确定度评定与表示》对 LC-MS 法测定人血浆中五味子醇甲的不确定度进行了评定^[2]。

1 仪器与试剂

Agilent 6410 LC-MS/MS 联用仪, ESI 离子源, Quantitative Analysis Version B.01.04 数据处理系统; XW-80A 微型旋涡混合仪 (上海沪西分析仪器厂); XS105 分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); SIGMA3-18k 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司)。

五味子醇甲对照品 (批号 110857-201111, 中国食品药品检定研究院); 地西洋对照品 (内标, 批号 170704-200302, 中国食品药品检定研究院); 甲醇、乙腈 (德国 Merck 公司), 色谱纯; 水为自制超纯

收稿日期: 2014-10-15

基金项目: 国家“十二五”重大新药创制项目: “中药新药临床评价研究技术平台” (2012ZX09303-017); 国家临床重点专科建设项目经费资助 (2013 年); 国家中医药管理局临床中药学重点学科 (2009 年); 辽宁中医药大学杏林学者青蓝工程 (2013 年)

作者简介: 杨 瑞 (1983—), 女, 博士在读, 助理研究员, 研究方向为药物新剂型与药代动力学。

Tel: (024)86803171 E-mail: yang_rui1983@163.com

***通信作者** 李国信, 男, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 临床药理研究。Tel: (024)86803316 E-mail: syyljdlgx024@126.com

水; 空白血浆由辽宁中医药大学附属第二医院提供。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ Synergi POLAR-RP (30 mm×2.16 mm, 3.5 μm); 流动相为水 (A) - 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 15%~35% (B); 5~18 min, 35% (B); 18~23 min, 35%~100% (B); 23~25 min, 100% (B)。体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL。

2.2 质谱条件

ESI 离子源; Gas Flow 9 L/min, Gas Temp 350 °C, Nebulizer 275.8 kPa, Capillary 4 000 V; 正离子模式检测, 扫描方式为选择离子监测 (SIM), 用于定量的离子分别为五味子醇甲, [M+Na]⁺ *m/z* 455.0, Fragmentor: 350 V; 内标地西洋, [M+H]⁺ *m/z* 285.0, Fragmentor: 165 V; 扫描时间为 200 ms。

2.3 对照品工作液及内标溶液的配制

2.3.1 五味子醇甲对照品溶液配制 五味子醇甲标准溶液: 精密称取五味子醇甲对照品 12.26 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 1.226 g/L 的五味子醇甲储备液; 用甲醇稀释储备液配制五味子醇甲质量浓度为 6.13、24.52、122.60、1 226.00、2 452.00、6 130.00 μg/L 的系列标准溶液。

2.3.2 内标溶液的配制 精密称取地西洋对照品 12.18 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得 1.218 mg/mL 的地西洋储备液, 再用甲醇稀释至 121.8 μg/L 作为内标工作溶液。

2.4 血浆样品处理

精密量取 200 μL 血浆于 1.5 mL 空白离心管中, 精密加入 10 μL 内标溶液, 涡旋混匀 30 s, 加入 400 μL 乙腈, 涡旋混匀 2 min, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 40 °C N₂ 气下吹干, 100 μL 35% 乙腈复溶, 14 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 10 μL 进样分析。

2.5 含药标准血浆的配制

用移液器 (量程 0.5~10 μL) 分别精密量取五味子醇甲系列标准溶液 10 μL 于 1.5 mL 空白离心管中, N₂ 下吹干, 用移液器 (量程 10~200 μL) 加入 200 μL 空白血浆, 涡旋混匀, 配制成五味子醇甲质量浓度分别为 0.31、1.23、6.13、61.30、122.60、306.50 μg/L 的标准含药血浆, 用移液器 (量程 0.5~10 μL) 分别加入内标 10 μL。按上述方法配制 0.61、12.26、

245.20 μg/L 的含药标准血浆, 分别作为低、中和高浓度质控样品, 进行方法的精密度和回收率考察。

2.6 数学模型的建立

$$x = \frac{y-b}{a}$$

其中, *x* 为五味子醇甲的质量浓度, *y* 为五味子醇甲峰面积与内标地西洋峰面积之比, *a* 为标准曲线斜率, *b* 为标准曲线截距。

2.7 测量不确定度来源分析

生物样本中药物测定包括: (1) 标准血浆的制备: 这一过程涉及工作液的制备、加入空白血浆和内标, 其中工作液的制备受储备液配制 (影响因素包括对照品纯度、量瓶允差和称量) 和逐级稀释过程 (影响因素包括移液管允差) 的影响, 加入空白血浆和内标受移液器允差的影响; (2) 样品的处理: 涉及回收率问题; (3) 仪器测定; (4) 标准曲线的拟合; (5) 温度等。这些步骤中的每个因素都会对测定结果产生影响, 因此都是不确定度的来源。

3 不确定度的评定结果

3.1 A 类不确定度评定

由重复观测 (精密度) 引入的不确定度属于 A 类不确定度。按“2.5”项下方法分别配制五味子醇甲质量浓度为 0.31、1.23、6.13、61.30、122.60、306.50 μg/L 的标准血浆, 并平行配制低、中、高浓度质控样品各 6 份, 按“2.4”项下方法处理后进样, 以五味子醇甲信号的峰面积与内标信号的峰面积之比对样品质量浓度做线性回归。得到标准曲线方程, 将质控样品信号的峰面积与内标信号的峰面积之比代入标准曲线, 计算得到质控样品的浓度。一共重复进行 3 组, 配制和测定结果见表 1。

依据贝赛尔公式计算合并样本偏差:

$$S_p(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.064 5$$

$$S_p(x, M) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.870 4$$

$$S_p(x, H) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 16.747 3$$

公式中 *m* 为测量组数, *n* 为每组的测量次数 (本试验 *m* = 3, *n* = 6); 其中 *k* 为每组平行测定分数 (1, 2, ..., *n*), *j* 为组数 (1, 2, ..., *m*)。

表1 五味子醇甲重复测定浓度数据 ($n=18$)
Table 1 Repeatability for measurement of schisandrins concentration ($n=18$)

组别	质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	组别	质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	组别	质量浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
L1	x_{11} 0.52	M1	x_{11} 12.07	H1	x_{11} 245.01
	x_{12} 0.51		x_{12} 12.09		x_{12} 241.05
	x_{13} 0.55		x_{13} 11.84		x_{13} 239.48
	x_{14} 0.52		x_{14} 11.62		x_{14} 238.66
	x_{15} 0.62		x_{15} 11.08		x_{15} 246.55
	x_{16} 0.54		x_{16} 12.35		x_{16} 284.15
L2	x_{21} 0.57	M2	x_{21} 12.64	H2	x_{21} 259.65
	x_{22} 0.59		x_{22} 14.62		x_{22} 234.58
	x_{23} 0.55		x_{23} 13.05		x_{23} 226.58
	x_{24} 0.56		x_{24} 12.88		x_{24} 227.54
	x_{25} 0.55		x_{25} 12.44		x_{25} 229.81
	x_{26} 0.63		x_{26} 12.62		x_{26} 237.46
L3	x_{31} 0.67	M3	x_{31} 12.51	H3	x_{31} 239.51
	x_{32} 0.68		x_{32} 12.48		x_{32} 246.53
	x_{33} 0.64		x_{33} 11.08		x_{33} 248.55
	x_{34} 0.52		x_{34} 11.68		x_{34} 249.75
	x_{35} 0.67		x_{35} 11.52		x_{35} 249.65
	x_{36} 0.49		x_{36} 12.48		x_{36} 280.41

以每组6个值得平均值表示测量结果,则平均值的标准偏差为:

$$S_p(\bar{x}, L) = \frac{S_p(x, L)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.0645}{\sqrt{3 \times 6}} = 0.0152$$

$$S_p(\bar{x}, M) = \frac{S_p(x, M)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.8704}{\sqrt{3 \times 6}} = 0.2052$$

$$S_p(\bar{x}, H) = \frac{S_p(x, H)}{\sqrt{mn}} = \frac{16.7473}{\sqrt{3 \times 6}} = 3.9474$$

相对标准不确定度为:

$$u_r(1, L) = u_r(x, L) = \frac{u_r(\bar{x}, L)}{x, L} = \frac{0.0152}{0.5767} = 0.0264$$

$$u_r(1, M) = u_r(x, M) = \frac{u_r(\bar{x}, M)}{x, M} = \frac{0.2052}{12.2806} = 0.0167$$

$$u_r(1, H) = u_r(x, H) = \frac{u_r(\bar{x}, H)}{x, H} = \frac{3.9474}{245.8289} = 0.0161$$

3.2 B类不确定度评定

3.2.1 对照品称量引入的不确定度 采用减重法称量,天平灵敏度带来的不确定度可以忽略不计。依据计量检定证书,所用为十万分之一电子天平 $e=0.1$,按均匀分布考虑,天平的非线性误差为:

$$u(\Delta, \text{Nonlinear}) = \frac{a}{k} = \frac{1.0e}{\sqrt{3}} = 0.0577$$

天平自动调零作为1次扣皮,其中 $a=a_0$,则天平自动调零引起的误差为:

$$u(\Delta, \text{Zeroing}) = \frac{a_0}{k} = \frac{1.0e}{\sqrt{3}} = 0.0577$$

不考虑重复性误差时,天平的标准不确定度为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta, \text{Nonlinear}) + u^2(\Delta, \text{Zeroing})} = \sqrt{0.0577^2 + 0.0577^2} = 0.0816$$

不考虑重复性误差时,称量五味子醇甲的相对标准不确定度为

$$u_{c,r}(m_1) = \frac{u_c(m)}{m_1} = \frac{0.0816}{12.26} = 0.0067$$

$$u_{c,r}(m_2) = \frac{u_c(m)}{m_2} = \frac{0.0816}{12.18} = 0.0067$$

称量引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(2) = \sqrt{u_c^2(m_1) + u_c^2(m_2)} = \sqrt{0.0067^2 + 0.0067^2} = 0.0094$$

3.2.2 配制对照品溶液时引入的不确定度 配制对照品溶液时所用容量瓶为10 mL及100 mL容量瓶,其最大允许误差分别为 ± 0.02 、 ± 0.10 mL。由于温度对定容的影响非常小,忽略不计。按三角分布,容量瓶相对标准不确定度为:

$$u_r(x, V1) = \frac{a_1}{kx_1} = \frac{0.02}{\sqrt{6} \times 10} = 0.0008$$

$$u_r(x, V2) = \frac{a_1}{kx_2} = \frac{0.10}{\sqrt{6} \times 100} = 0.0004$$

标准溶液配制用到的移液管量程有:0~1、0~5 mL,各移液管的最大允许误差分别为 ± 0.008 、 ± 0.025 mL。由于温度对于移液管影响较小,忽略不计。按三角分布,其相对标准不确定度为:

$$u_r(x, P1) = \frac{a_1}{kx_1} = \frac{0.008}{\sqrt{6} \times 1} = 0.0033$$

$$u_r(x, P2) = \frac{a_1}{kx_2} = \frac{0.025}{\sqrt{6} \times 5} = 0.0020$$

标准溶液配制过程中用到12次10 mL容量瓶、2次100 mL容量瓶、5次移液管(0~1 mL,3次1 mL,1次0.5 mL和1次0.4 mL),7次移液管(0~5 mL,2次2 mL和5次5 mL),其相对标准不确定度为:

$$u_r(3) = \sqrt{11u_c^2(x, V1) + 3u_c^2(x, V2) + (3+0.5^2+0.4^2)u_c^2(x, P1) + [5+2 \times (\frac{2}{5})^2]u_c^2(x, P2)}$$

$$= \sqrt{11 \times 0.0008^2 + 3 \times 0.0004^2 + (3+0.5^2+0.4^2) \times 0.0033^2 + [5+2 \times (\frac{2}{5})^2] \times 0.0020^2}$$

$$= 0.0081$$

3.2.3 配制含药标准血浆时引入的不确定度 在离心管中加入200 μL 含药血浆和10 μL 内标溶液, 混匀, 不确定度主要由移液器引起。配制血浆标准液所用移液器量程有: 0.5~10、10~200 μL , 各移液器的最大允许误差分别为 ± 0.8 、 ± 3 μL 。由于温度对定容的影响非常小, 忽略不计。其相对标准不确定度为:

$$u_r(x_1) = \frac{a_1}{kx_1} = \frac{0.8}{\sqrt{3} \times 10} = 0.0462$$

$$u_r(x_2) = \frac{a_1}{kx_2} = \frac{3}{\sqrt{3} \times 100} = 0.0173$$

因此, 配制血浆溶液时的相对标准不确定度为:

$$u_r(4) = \sqrt{u_r^2(x_1) + u_r^2(x_2)} = \sqrt{0.0462^2 + 0.0173^2} = 0.0493$$

3.2.4 血浆样品提取过程引入的不确定度 按“2.5”项下方法配制低(L)、中(M)和高(H)浓度质控样品各3份, 按“2.4”项下方法处理后进样, 进行LC-MS测定, 得到相应药物峰面积和内标峰面积, 分别为 $A_s(H)$ 、 $A_i(H)$ 。按照相同方法配制相同低(L)、中(M)和高(H)浓度的提取后加入对照溶液的样品各3份, 直接进行LC-MS测定, 得到药物峰面积和内标峰面积, 分别记为 $A_s(D)$ 、 $A_i(D)$ 。五味子醇甲提取回收率 $= A_s(H)/A_i(H) / [A_s(D)/A_i(D)]$, 结果见表2。

表2 LC-MS法测定血浆中五味子醇甲的提取回收率 ($n=3$)

Table 2 Extraction recovery of schisandrin in plasma by

LC-MS ($n=3$)

五味子醇甲/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%			均值/%	RSD/%
0.61	80.15	84.05	88.72	84.31	4.29
12.26	98.75	101.39	105.30	101.81	3.30
245.20	82.58	83.25	85.73	83.85	1.66

表3 五味子醇甲与内标峰面积比值 ($n=9$)

Table 3 Peak area ratios of schisandrin to internal standard ($n=9$)

质量浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Y									
	第1天			第2天			第3天			
0.31	0.091	0.095	0.094	0.089	0.093	0.095	0.094	0.095	0.094	
1.23	1.498	1.558	1.537	1.610	1.592	1.571	1.507	1.579	1.534	
6.13	9.468	9.584	9.589	9.473	9.576	9.623	9.525	9.983	9.457	
61.30	91.967	92.949	92.470	92.354	93.237	93.005	92.553	92.178	91.998	
122.60	187.325	188.373	188.340	189.118	189.972	188.314	187.903	188.266	189.331	
306.50	469.914	463.334	462.920	472.213	473.884	472.228	473.254	474.219	473.673	

回收率的相对标准不确定度:

$$u_r(5, L) = u_r(R, L) = \frac{SD(L)}{\text{Mean}(L)\sqrt{n}} = \frac{4.29}{84.31 \times \sqrt{3}} = 0.0294$$

$$u_r(5, M) = u_r(R, M) = \frac{SD(M)}{\text{Mean}(M)\sqrt{n}} = \frac{3.30}{101.81 \times \sqrt{3}} = 0.0187$$

$$u_r(5, H) = u_r(R, H) = \frac{SD(H)}{\text{Mean}(H)\sqrt{n}} = \frac{1.66}{83.85 \times \sqrt{3}} = 0.0114$$

3.2.5 仪器量化不确定度 所用仪器型号为Agilent 6410, 其定量的允差为1%, 按均匀分布, 其相对标准不确定度为:

$$u_r(6) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.0058$$

3.2.6 样品不均匀性引入的测量不确定度 由于样品均为液态样品(标准溶液、血浆), 混合时用涡旋混合2 min, 因此由样品不均匀性带来的不确定度很小, 可忽略不计。

3.2.7 线性回归过程引入的不确定度 生物样本中药物测定时需要先建立标准曲线, 然后用标准曲线计算得到未知样品的浓度, 直线回归是最常用且最简单的一种, 回归方程的建立对计算未知样品的浓度至关重要。配制质量浓度(以五味子醇甲计算)依次为0.31、1.23、6.13、61.30、122.60、306.50 $\mu\text{g/L}$ 标准血浆样品, 样品处理后检测, 以 $y = A_s/A_i$ 计算不同质量浓度的 y 值(表3), 每个质量浓度每天各测定3次, 拟合1条标准曲线, 共测定3 d, 共拟合3条标准曲线(表4)。

表4 五味子醇甲标准曲线

Table 4 Standard curves of schisandrin

时间	标准曲线	r
第1天	$Y=1.541X-0.380$	1.000
第2天	$Y=1.568X-0.390$	0.999
第3天	$Y=1.540X-0.375$	1.000

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (ax_i + b)]^2}{N-2}} = 2.8136$$

自相关方差:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 632353.0656$$

用本方法测定低、中、高浓度质控样品 18 次, 得到平均质量浓度分别为 $\bar{x}_L = 0.5767$ 、 $\bar{x}_M = 12.2806$ 、 $\bar{x}_H = 245.8289 \mu\text{g/L}$, 其标准不确定度为:

$$u(x, L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = \frac{2.8136}{1.5497} \sqrt{\frac{1}{18} + \frac{1}{54} + \frac{(0.5767 - 83.0117)^2}{632353.0656}} = 0.5288$$

$$u(x, M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = \frac{2.8136}{1.5497} \sqrt{\frac{1}{18} + \frac{1}{54} + \frac{(12.2806 - 83.0117)^2}{632353.0656}} = 0.5199$$

$$u(x, H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = \frac{2.8136}{1.5497} \sqrt{\frac{1}{18} + \frac{1}{54} + \frac{(245.8289 - 83.0117)^2}{632353.0656}} = 0.6184$$

公式中, P 为测定 x 的总次数 ($P=18$); N 为测定标准血浆溶液的总次数 ($N=m \times n=6 \times 9=54$); j 为测定标准血浆的序号 ($j=1, 2, 3, \dots, N$); i 为每组标准血浆的序号 ($i=1, 2, 3, \dots, N$); 每组 $m=6$ 个标准血浆浓度的平均值; 第 i 个标准血浆溶液的浓度。

其相对标准不确定度为:

$$u_r(7, L) = u_r(x, L) = \frac{u(x, L)}{x, L} = \frac{0.5288}{0.5767} = 0.9170$$

$$u_r(7, M) = u_r(x, M) = \frac{u(x, M)}{x, M} = \frac{0.5199}{12.2806} = 0.0423$$

$$u_r(7, H) = u_r(x, H) = \frac{u(x, H)}{x, H} = \frac{0.6184}{245.8289} = 0.0025$$

3.3 合成不确定度的评定

五味子醇甲测定的相对标准不确定度为:

$$u_{c,r,L} = \sqrt{u_r^2(1, L) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, L) + u_r^2(6) + u_r^2(7, L)} = 0.9192$$

$$u_{c,r,M} = \sqrt{u_r^2(1, M) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, M) + u_r^2(6) + u_r^2(7, M)} = 0.0710$$

$$u_{c,r,H} = \sqrt{u_r^2(1, H) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, H) + u_r^2(6) + u_r^2(7, H)} = 0.0549$$

五味子醇甲测定的标准不确定度为:

$$u_{c,L} = u_{c,r,L} \times \bar{x}_L = 0.9192 \times 0.5767 = 0.54$$

$$u_{c,M} = u_{c,r,M} \times \bar{x}_M = 0.0710 \times 12.2806 = 0.88$$

$$u_{c,H} = u_{c,r,H} \times \bar{x}_H = 0.0549 \times 245.8289 = 13.50$$

3.4 扩展不确定度的评定

取 $k=2$, 对应的置信概率为 95.45%, 五味子醇甲测定的扩展不确定度为:

$$U_L = ku_{c,L} = 2 \times 0.54 = 1.08 \mu\text{g/L}$$

$$U_M = ku_{c,M} = 2 \times 0.88 = 1.76 \mu\text{g/L}$$

$$U_H = ku_{c,H} = 2 \times 13.50 = 27.00 \mu\text{g/L}$$

3.5 测量结果的表示

人血浆中低、中、高浓度质控样品中五味子醇甲的质量浓度可分别表示为 (0.58 ± 1.08) 、 (12.28 ± 1.76) 、 $(245.83 \pm 27.00) \mu\text{g/L}$, $k=2$ (95.45% 的置信区间)。

4 讨论

由于生物样品成分复杂、处理过程繁琐、检测过程多样化, 文献报道的生物样品分析领域测定结果的不确定度评定较少。随着国内外合作交流的增加以及检测标准的进一步完善^[3-4], 适应国际多边互认的要求, 不确定度评定也显得愈发重要。

由结果可知, 回归过程对低浓度质控样品不确定度贡献最大, 其次是血浆样品的配制及提取回收率, 其他分量对不确定度影响较小。因此, 在实际操作中, 应将不确定度较大的分量逐步分析, 找出影响因素和解决办法, 为方法学建立提供科学指导, 使测定结果更加准确可靠。

参考文献

- [1] 葛会奇, 贾天柱. 辽宁不同产地五味子中五味子醇甲的含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(2): 319-320.
- [2] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示 [S]. JJF1059. 1-2012.
- [3] 吴婷, 张军, 居文政, 等. HPLC-MS-MS 法测定人血浆中多潘立酮浓度的不确定度分析 [J]. 中国药事, 2012, 26(5): 459-477.
- [4] Gassner A L, Schappler J, Feinberg M, Rudaz, *et al.* Derivation of uncertainty functions from validation studies in biological fluids: Application to the analysis of caffeine and its major metabolites in human plasma samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1353: 121-130.