

LC-MS 法测定人血浆中人参皂苷 Re 浓度的不确定度评定

杨 瑞, 董晓茜, 张世良, 唐 思, 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 法测定人血浆中人参皂苷 Re 浓度的不确定度。方法 对 LC-MS 法测定人血浆中人参皂苷 Re 浓度的全过程进行分析, 建立数学模型, 确定影响不确定度的因素并对各个不确定度因素进行评估, 计算合成不确定度并进行扩展。结果 置信概率 P 为 95% 时, 血浆中低、中、高 (1.00、125.25、1 002.00 $\mu\text{g/L}$) 质量浓度人参皂苷 Re 的扩展不确定度分别为 4.38、19.80、199.60 $\mu\text{g/L}$ 。结论 本方法适用于 LC-MS 法测定人血浆中人参皂苷 Re 浓度的不确定度评定, 不确定度主要由线性回归过程引入。

关键词: 人参皂苷 Re; LC-MS 法; 血浆; 不确定度; 扩展不确定度

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2015) 06 - 0647 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.013

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

YANG Rui, DONG Xiao-qian, ZHANG Shi-liang, TANG Si, JING Bo-yu, XIA Su-xia, LI Guo-xin
Academe of Traditional Chinese Medicine of Liaoning Province, Shenyang 110034, China

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty in determination of ginsenoside Re 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-, mid-, and high-dose (1.00, 125.25, and 1 002.00 $\mu\text{g/L}$) ginsenoside Re was 4.38, 19.80, and 199.60 $\mu\text{g/L}$, respectively ($P = 95\%$). **Conclusion** This method is applicable to uncertainty evaluation of ginsenoside Re determination in human plasma, and the uncertainty of this method was mainly caused by linear regression.

Key words: ginsenoside Re; 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。本文建立了 LC-MS 法测定人血浆中的人参皂苷 Re^[1], 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 法测定人血浆中人参皂苷 Re 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)。

人参皂苷 Re 对照品 (批号 110703-201223, 中国食品药品检定研究院); 地西洋对照品 (内标, 批号 110754-201324, 中国食品药品检定研究院);

收稿日期: 2014-10-20

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, 研究方向为临床药理研究。Tel: (024)86803316 E-mail: syyljdlx024@126.com

甲醇、乙腈(德国 Merck 公司), 色谱纯; 水为自制超纯水; 空白血浆由辽宁中医药大学附属第二医院提供。

2 实验方法

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): 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

质谱条件: ESI 离子源; Gas Flow 9 L/min, Gas Temp 350 °C, Nebulizer 275.79 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人参皂苷 Re, [M+Na]⁺ *m/z* 969.6, Fragmentor: 320 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 人参皂苷 Re 对照品溶液配制 精密称取人参皂苷 Re 对照品 10.02 mg 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得 1.002 g/L 的人参皂苷 Re 储备液; 用乙腈稀释储备液配制人参皂苷 Re 质量浓度为 10.02、100.20、501.00、6 262.50、12 525.00、25 050.00 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) 分别精密量取人参皂苷 Re 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, 配制成人参皂苷 Re 质量浓度分别为 0.50、5.01、25.05、313.13、

626.25、1 252.50 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 1.00、125.25 和 1 002.00 μg/L 的含药标准血浆, 分别作为低(L)、中(M)和高(H)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 为人参皂苷 Re 的质量浓度 μg/L, y 为人参皂苷 Re 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, $u_r(1)$

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”项下方法分别配制人参皂苷 Re 血浆质量浓度为 0.50、5.01、25.05、313.13、626.25、1 252.00 μg/L 的标准血浆, 并平行配制低、中、高浓度质控样品各 6 份 ($n=6$), 按“2.4”项下方法处理后进样, 以人参皂苷 Re 信号的峰面积与内标信号的峰面积之比对样品浓度做线性回归。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 ($n=18$), 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:

$$S_p(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.1117 \mu\text{g/L}$$

$$S_p(x, M) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 9.7960 \mu\text{g/L}$$

$$S_p(x, H) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 50.8518 \mu\text{g/L}$$

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 人参皂苷 Re 重复测定数据 ($n=18$)

Table 1 Repeatability for measurement of ginsenoside Re ($n=18$)

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}	0.94	M1 x_{11}	122.39	H1 x_{11}	1120.84
x_{12}	0.93	x_{12}	124.63	x_{12}	1142.50
x_{13}	0.88	x_{13}	116.02	x_{13}	1144.38
x_{14}	1.15	x_{14}	133.55	x_{14}	1133.52
x_{15}	1.01	x_{15}	130.8	x_{15}	1019.20
x_{16}	1.06	x_{16}	127.85	x_{16}	1098.45
L2 x_{21}	1.15	M2 x_{21}	105.83	H2 x_{21}	1057.13
x_{22}	1.08	x_{22}	115.64	x_{22}	1106.38
x_{23}	0.87	x_{23}	114.82	x_{23}	1098.30
x_{24}	1.07	x_{24}	118.35	x_{24}	1122.14
x_{25}	1.16	x_{25}	124.65	x_{25}	1078.68
x_{26}	0.89	x_{26}	118.32	x_{26}	1116.37
L3 x_{31}	0.91	M3 x_{31}	105.39	H3 x_{31}	1137.85
x_{32}	0.93	x_{32}	113.14	x_{32}	1180.69
x_{33}	0.86	x_{33}	108.26	x_{33}	1199.88
x_{34}	1.07	x_{34}	114.11	x_{34}	1168.70
x_{35}	0.89	x_{35}	122.18	x_{35}	1194.87
x_{36}	1.03	x_{36}	99.14	x_{36}	1176.77

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:

$$S_p(\bar{x}, L) = \frac{S_p(x, L)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.1117}{\sqrt{3 \times 6}} = 0.0263$$

$$S_p(\bar{x}, M) = \frac{S_p(x, M)}{\sqrt{mn}} = \frac{9.7960}{\sqrt{3 \times 6}} = 2.3089$$

$$S_p(\bar{x}, H) = \frac{S_p(x, H)}{\sqrt{mn}} = \frac{50.8518}{\sqrt{3 \times 6}} = 11.9859$$

$$u_r(1, L) = u_r(x, L) = \frac{u_r(\bar{x}, L)}{x, L} = \frac{0.0263}{0.9933} = 0.0265$$

$$u_r(1, M) = u_r(x, M) = \frac{u_r(\bar{x}, M)}{x, M} = \frac{2.3089}{117.5039} = 0.0196$$

$$u_r(1, H) = u_r(x, H) = \frac{u_r(\bar{x}, H)}{x, H} = \frac{11.9859}{1127.5917} = 0.0106$$

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, $u_r(2)$ 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:

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

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:

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

不考虑重复性误差时, 天平的标准不确定度为:

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

不考虑重复性误差时, 称量人参皂苷 Re 的相对标准不确定度为:

$$u_{c,r}(m_1) = \frac{u_c(m)}{m_1} = \frac{0.0816}{10.02} = 0.0081$$

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

称量引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(2) = \sqrt{u_{c,r}^2(m_1) + u_{c,r}^2(m_2)} = \sqrt{0.0081^2 + 0.0067^2} = 0.0105$$

3.2.2 配制对照品溶液时引入的不确定度, $u_r(3)$

配制对照品溶液时所用量瓶为 10 mL 及 100 mL 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, 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 11 次 10 mL 量瓶、2 次 100 mL 量瓶、4 次移液管 (0~1 mL, 1 次 0.2 mL、

1次0.5 mL和2次1 mL), 8次移液管(0~5 mL, 3次2 mL、1次4 mL和4次5 mL), 其相对标准不确定度为:

$$u_r(3) = \sqrt{11u_r^2(x, V1) + 2u_r^2(x, V2) + (2 + 0.2^2 + 0.5^2)u_r^2(x, P1) + [4 + 3 \times (\frac{2}{5})^2 + (\frac{1}{4})^2]u_r^2(x, P2)} = 0.0071$$

3.2.3 配制含药标准血浆时引入的不确定度, $u_r(4)$ 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 μL、10~200 μL, 各移液器的最大允许误差分别为±0.8 μL、±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, $u_r(5)$ 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 $A_s(D)$ 、 $A_i(D)$ 。人参皂苷 Re 提取回收率(%) = $[A_s(H) / A_i(H)] / [A_s(D) / A_i(D)] \times 100\%$, 结果见表2。

表2 LC-MS法测定血浆中人参皂苷 Re 的提取回收率 (n=3)
Table 2 Extraction recovery of ginsenoside Re in plasma by LC-MS method (n=3)

人参皂苷 Re/(μg·L ⁻¹)	回收率/%		均值	SD
1.00	87.94	78.24	81.50	82.56 4.94
125.25	71.19	82.26	88.01	80.49 8.55
1 002.00	70.25	71.23	87.01	76.16 9.41

回收率的相对标准不确定度:

$$u_r(5, L) = u_r(R, L) = \frac{SD(L)}{Mean(L)\sqrt{n}} = \frac{4.94}{82.56 \times \sqrt{3}} = 0.0345$$

$$u_r(5, M) = u_r(R, M) = \frac{SD(M)}{Mean(M)\sqrt{n}} = \frac{8.55}{80.49 \times \sqrt{3}} = 0.0613$$

$$u_r(5, H) = u_r(R, H) = \frac{SD(H)}{Mean(H)\sqrt{n}} = \frac{9.41}{76.16 \times \sqrt{3}} = 0.0713$$

3.2.5 仪器量化不确定度, $u_r(6)$ 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, $u_r(7)$ 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。配制人参皂苷 Re 质量浓度为 0.50、5.01、25.05、313.13、626.25、1 252.50 μg/L 标准血浆样品, 样品处理后检测, 以 $y=As/Ai$ 计算不同浓度的 y 值, 每个浓度每天各测定 3 次, 拟合 1 条标准曲线, 测定 3 d, 拟合 3 条标准曲线(表3)。

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (ax_i + b)]^2}{N - 2}} = 3.7453$$

自相关方差:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 11096906.5851$$

用本方法测定低、中、高浓度质控样品 18 次, 得到平均浓度 $\bar{x}_L = 0.9933$ 、 $\bar{x}_M = 117.5039$ 、 $\bar{x}_H = 1127.5917$, 其标准不确定度为:

$$u(x, L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 2.1883$$

$$u(x, M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 2.1039$$

$$u(x, H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 2.6403$$

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 × n = 6 × 9 = 54); j 为测定标准血浆的序号 (j = 1, 2, 3, ..., N); i 为每组标准血浆的序号 (i = 1, 2, 3, ..., N); \bar{x} 为每组 m = 6 个标准血浆浓度的平均值; x_i 为第 i 个标准血浆溶液的浓度^[3]。

表3 人参皂苷 Re 与内标峰面积比值和人参皂苷 Re 实测浓度(n=9)

Table 3 Peak area ratio of ginsenoside Re to internal standard and measured concentration of ginsenoside Re (n=9)

浓度 (μg/L)	第 1 天			第 2 天			第 3 天		
	y ₁	y ₂	y ₃	y ₁	y ₂	y ₃	y ₁	y ₂	y ₃
0.50	0.255	0.245	0.255	0.260	0.240	0.245	0.255	0.265	0.260
5.01	2.515	2.595	2.520	2.620	2.440	2.580	2.380	2.630	2.555
25.05	12.060	12.065	12.062	11.495	11.755	11.295	13.220	12.375	12.720
313.13	156.810	159.760	158.315	165.125	162.380	164.255	167.530	158.920	160.085
626.25	310.070	308.945	309.470	315.260	312.265	313.390	316.445	315.230	317.710
1 252.50	624.000	628.500	632.140	636.000	627.000	632.500	632.500	627.000	625.685

浓度 (μg/L)	第 1 天			第 2 天			第 3 天		
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃	x ₁	x ₂	x ₃
0.50	0.50	0.48	0.50	0.50	0.46	0.47	0.50	0.52	0.51
5.01	5.03	5.19	5.04	5.21	4.85	5.13	4.68	5.17	5.02
25.05	24.16	24.17	24.16	22.92	23.44	22.52	25.98	24.32	24.99
313.13	314.24	320.15	317.25	329.57	324.09	327.83	329.14	312.22	314.51
626.25	621.37	619.12	620.17	629.24	623.26	625.51	621.70	619.32	624.19
1 252.50	1 250.49	1 259.51	1 266.80	1 269.44	1 251.48	1 262.46	1 242.64	1 231.83	1 229.25
平均标曲参数	a	0.499			0.501			0.509	
	b	0.005			0.010			-0.002	
	r	1.000			0.999			0.999	

6 个标准血浆排序为 i=1, 2, 3, 4, 5, 6 (m=6); 每个标准血浆测量 3 次的排序为 j=1, 2, 3 (n=9)

其相对标准不确定度为:

$$u_r(7, L) = u_r(x, L) = \frac{u(x, L)}{x, L} = \frac{2.1883}{0.9933} = 2.2030$$

$$u_r(7, M) = u_r(x, M) = \frac{u(x, M)}{x, M} = \frac{2.1039}{117.5039} = 0.0179$$

$$u_r(7, H) = u_r(x, H) = \frac{u(x, H)}{x, H} = \frac{2.6403}{1127.5917} = 0.0023$$

3.3 合成不确定度的评定

人参皂苷 Re 浓度测定的相对标准不确定度为:

$$u_{c,r,H} = \sqrt{u_r^2(1, H) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, H) + u_r^2(6) + u_r^2(7, H)} = 0.0885$$

$$u_{c,r,L} = \sqrt{u_r^2(1, L) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, L) + u_r^2(6) + u_r^2(7, L)} = 2.2040$$

$$u_{c,r,M} = \sqrt{u_r^2(1, M) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5, M) + u_r^2(6) + u_r^2(7, M)} = 0.0842$$

人参皂苷 Re 浓度测定的标准不确定度为:

$$u_{c,L} = u_{c,r,L} \times \overline{x, L} = 2.2040 \times 0.9933 = 2.19 \mu\text{g/L}$$

$$u_{c,M} = u_{c,r,M} \times \overline{x, M} = 0.0842 \times 117.5039 = 9.90 \mu\text{g/L}$$

$$u_{c,H} = u_{c,r,H} \times \overline{x, H} = 0.0885 \times 1127.5917 = 99.80 \mu\text{g/L}$$

3.4 扩展不确定度的评定

取 k=2, 对应的置信概率为 95.45%, 人参皂苷 Re 浓度测定的扩展不确定度为:

$$U_L = k u_{c,L} = 2 \times 2.19 = 4.38 \mu\text{g/L}$$

$$U_M = k u_{c,M} = 2 \times 9.90 = 19.80 \mu\text{g/L}$$

$$U_H = k u_{c,H} = 2 \times 99.80 = 199.60 \mu\text{g/L}$$

3.5 测量结果的表示

人血浆中低、中、高浓度质控样品中人参皂苷 Re 的浓度可分别表示为 (0.99 ± 4.38) μg/L、(117.50 ± 19.80) μg/L、(1 127.59 ± 199.60) μg/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, 其次是提取回收率及血浆样品的配

(下转第 671 页)

者阴道出血量。

综上所述,米索前列醇联合米非司酮治疗妊娠10~16周稽留流产能提高患者完全流产率,排胎时间与终止相同孕周正常妊娠疗效相当,且不增加患者不良反应。患者阴道出血量将增高,但出血量在正常范围内。

参考文献

- [1] 周素红. 米非司酮配伍米索前列醇与苯甲酸雌二醇在稽留流产清宫术前应用的临床效果比较 [J]. 生殖与避孕, 2013, 33(11): 786-788.
- [2] 刘敏. 米非司酮配伍米索前列醇行无痛清宫术治疗稽留流产临床分析 [J]. 河北医药, 2013, 35(1): 37-38.
- [3] Sioutas A, Sandström A, Fiala C. Effect of bacterial vaginosis on the pharmacokinetics of misoprostol in early pregnancy [J]. *Human reprod*, 2012, 27(2): 252-259.
- [4] 马淑云, 魏琳. 三种不同方法治疗稽留流产的疗效分析 [J]. 河北医学, 2013, 19(5): 644-646.
- [5] 陈培芳. 复方米非司酮配伍米索前列醇联合清宫术治疗稽留流产临床观察 [J]. 甘肃医药, 2012, 31(12): 916-918.
- [6] 刘青青, 叶宁荷, 陈艳, 等. 复方米非司酮用于稽留流产的疗效观察 [J]. 生殖与避孕, 2011, 31(3): 214-215.
- [7] Vijaya Bharathi D, Jagadeesh B, Hotha K K. Development and validation of highly sensitive method for determination of misoprostol free acid in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study [J]. *J Chrom B, Anal Tech Biomed Life Sci*, 2011, 879(26): 192-198.
- [8] 马淑云. 戊酸雌二醇配伍米非司酮加米索前列醇治疗稽留流产的临床观察 [J]. 中国美容医学, 2012, 21(12): 262-263.
- [9] 张旭梅, 顾珏, 柳露. 不同剂量米非司酮配伍米索前列醇治疗稽留流产的疗效比较 [J]. 中日友好医院学报, 2011, 1(5): 282-284.
- [10] 魏华莉. 米非司酮配伍米索前列醇治疗稽留流产临床分析 [J]. 河北医学, 2011, 17(7): 933-935.

(上接第 651 页)

制,其他分量对不确定评定影响较小。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] 陈广通, 杨敏, 果德安. 人参皂苷 Re 在大鼠体内的代谢研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1540-1543.
- [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]. *J Chromat A*, 2014, 1353: 121-130.