

【 评价方法学 】

UPLC-MS/MS 测定大鼠尿样中 26-OH-PD 浓度的不确定度评定

林美好¹, 张楠淇², 王翠竹², 朱海林², 刘金平², 李平亚^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 吉林大学再生医学科学研究所新药研究室, 吉林 长春 130021

摘要: 目的 评定超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定大鼠尿样中 26-OH-PD 浓度的不确定度。方法 分析 UPLC-MS/MS 法测定大鼠尿样中 26-OH-PD 浓度的不确定度来源, 根据各分量计算出合成不确定度并进行了扩展。结果 大鼠尿样中低浓度(6.16 ng/mL)、中浓度(97.94 ng/mL)和高浓度(398.02 ng/mL) 26-OH-PD 的扩展不确定度分别为 1.44、6.97、22.05 ng/mL ($P=95\%$, $k=2$)。结论 UPLC-MS/MS 法测定大鼠尿样中 26-OH-PD 低浓度样品的不确定度主要分别由线性拟合引入, 中、高浓度样品的不确定度主要由仪器允差引入。该法适用于评定 UPLC-MS/MS 法测定尿样中 26-OH-PD 的不确定度研究, 能为复杂生物样品分析过程的不确定度评定提供一定参考。

关键词: 不确定度; 26-OH-PD; UPLC-MS/MS; 尿样浓度

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)04-0582-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.04.015

Uncertainty evaluation in concentration determination of 26-OH-PD in human urine by UPLC-MS/MS

LIN Mei-yu¹, ZHANG Nan-qi², WANG Cui-zhu², ZHU Hai-lin², LIU Jin-ping², LI Ping-ya²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty in 26-OH-PD determination in human urine by UPLC-MS/MS. **Methods** The whole process of the 26-OH-PD determination was analyzed and the uncertainty from various sources were calculated, and then the combined and expanded uncertainty were also evaluated. **Results** The expanded uncertainty of 26-OH-PD at low (6.16 ng/mL), medium (97.94 ng/mL) and high (398.02 ng/mL) level was 1.44 ng/mL, 6.97 ng/mL and 22.05 ng/mL ($P=95\%$, $k=2$). **Conclusion** Calibration curve fitting was the main source of uncertainty for the low concentration of 26-OH-PD, and instrument tolerance were the main source of uncertainty for the determination of 26-OH-PD at high and medium concentration. This method could be used to evaluate the uncertainty of 26-OH-PD determination in urine. Reference was also provided for the uncertainty evaluation in drug analysis.

Key words: uncertainty; 26-OH-PD; UPLC-MS/MS; urine concentration

生物样品中药物浓度的检测结果是临床前药物代谢动力学试验数据分析的基础, 也是新药安全性与有效性评价的依据。因此, 客观评价测定结果的可靠性具有重要意义。目前, 国内外普遍使用测量不确定度来评价测量结果的可靠性。测量不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性, 与测量结

果相关联的一个参数^[1-2]。

26-OH-PD 结构为达玛-20S, 25R-环氧-3 β , 12 β , 26-三醇, 是人参总皂苷经碱降解/氧化-环合结构修饰得到的新型人参二醇型皂苷元, 其结构新颖, 经生物活性筛选证明其具有良好的抗癌作用, 有望成为创新抗癌候选药物, 目前处于研发阶段^[3-5]。由于

收稿日期: 2017-10-30

第一作者: 林美好(1989—), 女, 江西萍乡人, 讲师, 博士, 研究方向为天然药物化学成分及生物活性的研究。Tel: 18773193669 E-mail:

linmeiyuyouth@sina.com

*通信作者: 李平亚, Tel: 13804350648 E-mail: lipy@jlu.edu.cn

生物基质比较复杂,处理步骤较多,因此不确定度评定较为困难,目前尚未见大鼠尿样中 26-OH-PD 含量测定的不确定度评定报道。本论文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 UPLC-MS/MS 法测定大鼠尿样中 26-OH-PD 含量的不确定度进行评估,探讨复杂生物基质中药物浓度测定的不确定度评定方法,为其方法学的研究和检测报告的评估提供指导和依据。

1 材料与方法

仪器和设备:美国 Waters 公司 Acquity XEVO TQ-S 型超高压液相色谱-三重四级杆串联质谱联用仪,配电喷雾离子化电源(ESI),控制软件为 Masslynx V4.1;FA1104N 分析天平(上海民桥医疗器械有限公司);T.G.L-16aR 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司)。

标准品及内标:26-OH-PD 由吉林大学再生医学科学研究所新药研究室提供,相对分子质量为 476.4,批号 20130915,纯度 99.0%。内标伪人参皂苷 DQ(简称 PDQ)由吉林大学再生医学科学研究所新药研究室提供,相对分子质量为 476.4,批号 20130812,纯度 99.2%。

试剂:甲醇、乙酸铵(美国 Fisher 公司),色谱纯;醋酸乙酯(上海光复化学试剂厂),色谱纯;自制去离子水;Wistar 大鼠空白尿样。

2 方法

2.1 UPLC 条件

色谱柱使用 Waters 公司的 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) 色谱柱,液相分离采用等度洗脱,26-OH-PD 和内标 PDQ 的保留时间分别为 1.65 min 和 1.10 min,每一个样品分析用时 2.5 min,流动相由甲醇:水(10 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸)=83:17 组成,体积流量 0.4 mL/min,柱温为 40 °C,进样量为 2 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(Electrospray ionization, ESI),在正离子电离模式下,选用多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM)的质谱扫描方式进行测定,用于定量分析的离子对(m/z):477.4→143.1(26-OH-PD),477.4→143.1(PDQ)。毛细管电压 0.9 kV,离子源温度 150 °C,雾化温度 450 °C,雾化气体流量 800 L/h,碰撞气体流量 0.15 mL/min。

2.3 溶液配制

2.3.1 26-OH-PD 对照品溶液的配制 储备液的配制:精密称取 26-OH-PD 标准品 10.03 mg 于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解定容至刻度,得到 1.00 mg/mL 的储备液。

标准曲线工作液配制:精密吸取 26-OH-PD 储备液 1 mL 转移至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,得 100 μg/mL 的 26-OH-PD 工作液,再用甲醇逐级稀释,得到浓度为 20、50、100、250、500、1 500、2 500、5 000 ng/mL 的标准曲线工作液。

质控样品工作液配制:精密吸取 100 μg/mL 的 26-OH-PD 工作液,再用甲醇逐级稀释,得到浓度分别为 60、1 000、4 000 ng/mL 的低、中、高质控样品工作液。

2.3.2 标准含药尿样的配制 尿样标准曲线样品配制:分别取标准曲线工作液各 10 μL,分别加 90 μL 大鼠空白尿液配制成终浓度为 2、5、10、25、50、150、250、500 ng/mL 的尿液标准曲线样品。

尿样质控样品配制:按上述方法配制成 6、100、400 ng/mL 的低、中、高大鼠尿液质控样品,进行方法的精密度和回收率考察。

2.4 尿样的预处理

将尿样于室温下解冻,混匀 10 s。加入 30 μL 内标工作液(250 ng/mL)于 2 mL EP 管中,加入尿液样品 100 μL,振荡 30 s 混匀,然后加入 1 mL 的醋酸乙酯,振荡 2 min 后,12 000 r/min 离心 10 min。取上层有机相 800 μL 转移至干净的玻璃管中,于 40 °C N₂ 气流下吹干,并用 400 μL 甲醇复溶,振荡 2 min 后,12 000 r/min 离心 10 min,转移至进样瓶中。

2.5 数学模型的建立

以 26-OH-PD 与其内标峰面积之比为纵坐标,26-OH-PD 质量浓度为横坐标,权重因子为 $1/X^2$,加权最小二乘法进行线性拟合,标准曲线为 $y=ax+b$, x 为 26-OH-PD 质量浓度, y 为 26-OH-PD 峰面积与内标峰面积之比, a 为标准曲线的斜率, b 为标准曲线的截距。待测样品经分析后,将样品峰面积与其内标峰面积之比代入标准曲线,计算得到 26-OH-PD 的质量浓度 $x=(y-b)/a$ 。

3 不确定度的评定

3.1 测量不确定度的来源

根据整个实验流程,测量的不确定度主要来源于重复性、天平称量、工作液配制、样品制备、提取回

收率、基质效应、仪器允差、标曲拟合等因素,见图1。

3.2 各分量不确定度的评定

3.2.1 A类不确定度评定 重复性引入的测量不确定度 $u_r(1)$,按“2.3”项方法分别配制标准曲线

尿液样品,并平行配制 6、100、400 ng/mL 的低、中、高尿液质控样品,共 3 组 ($m=3$),每组平行 6 次 ($n=6$),按“2.4”项方法处理后测定,结果见表 1。

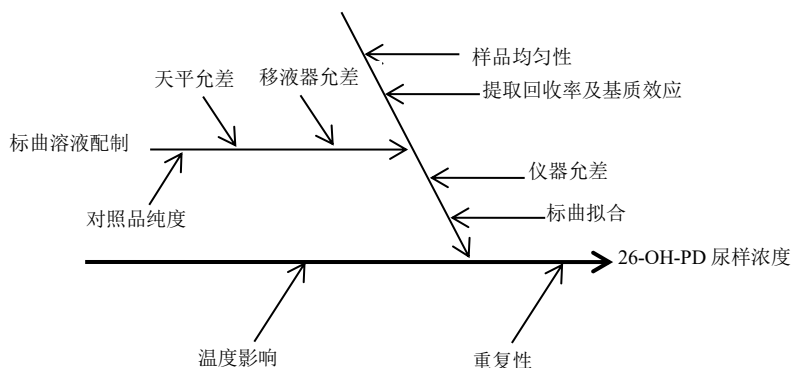


图1 不确定度来源分析

Fig.1 Analysis of uncertainty source

表1 26-OH-PD 重复测定数据 ($n=18$)

Table 1 Repeatability measurement concentration data of 26-OH-PD ($n=18$)

组别	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	组别	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	组别	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)
L1	x_{11} 6.85	M1	x_{11} 95.70	H1	x_{11} 398.99
	x_{12} 6.27		x_{12} 105.70		x_{12} 394.99
	x_{13} 6.50		x_{13} 103.13		x_{13} 374.99
	x_{14} 5.93		x_{14} 98.84		x_{14} 424.70
	x_{15} 5.36		x_{15} 96.70		x_{15} 444.13
	x_{16} 6.05		x_{16} 105.41		x_{16} 378.27
L2	x_{21} 6.07	M2	x_{21} 103.97	H2	x_{21} 370.22
	x_{22} 5.73		x_{22} 85.64		x_{22} 377.31
	x_{23} 5.84		x_{23} 111.06		x_{23} 376.19
	x_{24} 6.84		x_{24} 109.39		x_{24} 409.53
	x_{25} 6.73		x_{25} 90.08		x_{25} 395.36
	x_{26} 6.84		x_{26} 87.58		x_{26} 396.33
L3	x_{31} 6.45	M3	x_{31} 97.44	H3	x_{31} 386.81
	x_{32} 5.20		x_{32} 95.72		x_{32} 396.97
	x_{33} 6.45		x_{33} 96.34		x_{33} 414.94
	x_{34} 6.70		x_{34} 94.94		x_{34} 416.03
	x_{35} 5.45		x_{35} 93.69		x_{35} 410.09
	x_{36} 5.58		x_{36} 91.66		x_{36} 398.53
	$\bar{x}_L$ 6.16		$\bar{x}_M$ 97.94		$\bar{x}_H$ 398.02

用贝塞尔公式计算合并样本偏差:

$$S_p(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.558$$

$$S_p(x, M) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 7.204$$

$$S_p(x, H) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 19.096$$

公式中 m 为测量组数, n 为每组测量次数(本试验 $m=3$, $n=6$); k 为每组平行测定份数(1, 2, ..., n), j 为组数(1, 2, ..., m)。

以每组 6 个值的平均值表示测量结果, 则平均

值的标准偏差为:

$$S_p(\overline{x}, L) = \frac{S_p(x, L)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.558}{\sqrt{3 \times 6}} = 0.131$$

$$S_p(\overline{x}, M) = \frac{S_p(x, M)}{\sqrt{mn}} = \frac{7.204}{\sqrt{3 \times 6}} = 1.698$$

$$S_p(\overline{x}, H) = \frac{S_p(x, H)}{\sqrt{mn}} = \frac{19.096}{\sqrt{3 \times 6}} = 4.501$$

相对标准测量不确定度为:

$$u_r(1, L) = \frac{S_p(\overline{x}, L)}{x_L} = \frac{0.131}{6.16} = 0.0213$$

$$u_r(1, M) = \frac{S_p(\overline{x}, M)}{x_M} = \frac{1.698}{97.94} = 0.0173$$

$$u_r(1, H) = \frac{S_p(\overline{x}, H)}{x_H} = \frac{4.501}{398.02} = 0.0113$$

3.2.2 B类不确定度评定

(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。非线性误差 $u(\Delta, \text{nonlinear})$ 和自动调零 $u(\Delta, \text{zeroing})$ 。按均匀分布考虑, 包含因子 $k = \sqrt{3}$, 随机变量半宽 $\alpha = 0.5e$, 依据计量检定证书, 检定分度值 $e = 0.1 \text{ mg}$ 。

天平的非线性不确定度为:

$$u(\Delta, \text{nonlinear}) = \frac{\alpha}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = 0.029$$

自动调零作为1次扣皮, 则 $\alpha_0 = \alpha$, 天平的自动调零不确定度为:

$$u(\Delta, \text{zeroing}) = \frac{\alpha_0}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = 0.029$$

天平的标准不确定度为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta, \text{nonlinear}) + u^2(\Delta, \text{zeroing})} = 0.0410$$

称量 26-OH-PD 10.03 mg, 称量 26-OH-PD (W) 时引入的相对不确定度为:

$$u_r(2) = \frac{u_c(m)}{W} = \frac{0.0410}{10.03} = 0.00409$$

(2) 标准溶液配制引入的不确定度 $u_r(3)$

容量瓶定容引入的测量不确定度: 配制储备液及标准溶液所用容量瓶为 10 mL (V_1) 及 100 mL (V_2), 最大允差分别为 $\pm 0.02 \text{ mL}$ 及 $\pm 0.1 \text{ mL}$ 。由于温度控制在 20°C , 对定容的影响非常小, 可忽略不计。按三角形分布, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 两种规格容量

瓶相对标准不确定度为:

$$u_r(V) = \frac{a}{k \cdot x} = \frac{0.02}{\sqrt{6} \cdot 10} = 0.000817$$

移液器引入的测量不确定度: 配制标准溶液时用到移液器均为 Dragonmed, 用到量程有 10~100 μL (P_1), 20~200 μL (P_2), 100~1 000 μL (P_3), 最大允差分别为 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 。按三角形分布, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 3 种规格移液器相对标准不确定度为:

$$u_r(P_1) = \frac{a_1}{k \cdot x_1} = \frac{0.8\% \cdot 100}{\sqrt{6} \cdot 100} = 0.00327$$

$$u_r(P_2) = \frac{a_2}{k \cdot x_2} = \frac{0.6\% \cdot 200}{\sqrt{6} \cdot 200} = 0.00245$$

$$u_r(P_3) = \frac{a_3}{k \cdot x_3} = \frac{0.6\% \cdot 1000}{\sqrt{6} \cdot 1000} = 0.00245$$

标准溶液配制引入的测量不确定度: 26-OH-PD 对照溶液配制共使用 2 次 10 mL 量瓶, 5 次 10~100 μL 移液器 (5 次 100 μL), 2 次 20~200 μL 移液器 (2 次 200 μL), 13 次 100~1000 μL 移液器 (1 次 250 μL 、1 次 300 μL 、2 次 500 μL 、1 次 700 μL 、1 次 750 μL 、2 次 800 μL 、5 次 900 μL)。其相对标准不确定度为:

$$u_r(3) = \sqrt{2u_r^2(V) + 5u_r^2(P_1) + 2u_r^2(P_2) + (0.25^2 + 0.3^2 + 2 \times 0.5^2 + 0.7^2 + 0.75^2 + 2 \times 0.8^2 + 5 \times 0.9^2)u_r^2(P_3)} = 0.0104$$

(3) 标准含药尿样配制引入的不确定度 $u_r(4)$

按“2.4”项下进行尿样配制, 移液器量程有 10~100 μL (P_1), 100~1000 μL (P_3), 5~50 μL (P_4), 最大允差分别为 $\pm 0.8\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 、 $\pm 0.6\%$ 。按三角形分布, 包含因子 $k = \sqrt{6}$, 移液器相对标准不确定度为:

$$u_r(P_4) = \frac{a_4}{k \cdot x_4} = \frac{0.6\% \times 50}{\sqrt{6} \times 50} = 0.00245$$

其相对标准不确定度为:

$$u_r(4) = \sqrt{u_r^2(P_1) + (1^2 + 0.8^2 + 0.4^2)u_r^2(P_3) + 0.6^2 u_r^2(P_4)} = 0.00486$$

(4) 提取回收率和基质效应引入的不确定度 $u_r(5)$ 、 $u_r(6)$

提取回收率是计算尿液质控样品提取后的峰面积与空白尿液样品提取后加入质控工作液的峰面积的比值。基质效应是计算尿液存在下的峰面积与尿液不存在下的峰面积比值。低、中、高质控样品的回收率和基质效应试验结果见表 2。

表2 26-OH-PD在尿液中的回收率和基质效应($n=6$)
Table 2 Recovery and matrix effect of 26-OH-PD in urine ($n=6$)

理论浓度/(ng·mL ⁻¹)	回收率/%		基质效应/%	
	均值	SD/%	均值	SD/%
6	95.32	2.15	98.63	3.99
100	98.79	3.20	95.86	3.86
400	98.61	2.74	96.78	1.17

提取回收率的相对标准测量不确定度为:

$$u_r(5, L) = u_r(R, L) = \frac{SD(L)}{Mean(L) \cdot \sqrt{n}} = \frac{2.15\%}{95.32\% \cdot \sqrt{6}} = 0.00921$$

$$u_r(5, M) = u_r(R, M) = \frac{SD(M)}{Mean(M) \cdot \sqrt{n}} = \frac{3.20\%}{98.79\% \cdot \sqrt{6}} = 0.0132$$

$$u_r(5, H) = u_r(R, H) = \frac{SD(H)}{Mean(H) \cdot \sqrt{n}} = \frac{2.74\%}{98.61\% \cdot \sqrt{6}} = 0.0113$$

基质效应的相对标准测量不确定度为:

$$u_r(6, L) = u_r(ME, L) = \frac{SD(L)}{Mean(L) \cdot \sqrt{n}} = \frac{3.99\%}{98.63\% \cdot \sqrt{6}} = 0.0165$$

$$u_r(6, M) = u_r(ME, M) = \frac{SD(M)}{Mean(M) \cdot \sqrt{n}} = \frac{3.86\%}{95.86\% \cdot \sqrt{6}} = 0.0164$$

$$u_r(6, H) = u_r(ME, H) = \frac{SD(H)}{Mean(H) \cdot \sqrt{n}} = \frac{1.17\%}{96.78\% \cdot \sqrt{6}} = 0.00494$$

(5) 仪器量化引入的不确定度 $u_r(7)$

质谱仪量化和液相仪吸样的最大允差分别为3%和1%，按均匀分布， $k=\sqrt{3}$ ，仪器量化引入的相对标准测量不确定度为:

$$u_r(7) = \sqrt{u_r^2(\text{质谱}) + u_r^2(\text{液相})} = \sqrt{(0.03/\sqrt{3})^2 + (0.01/\sqrt{3})^2} = 0.0183$$

(6) 线性拟合过程引入的不确定度 $u_r(8)$

标准曲线含8个浓度，26-OH-PD与内标的峰面积比见表3，用DAS3.0计算得到5条标准曲线的斜率和截距见表4。用拟合的标准曲线反算出各对照品尿样中的26-OH-PD浓度见表5。

表3 26-OH-PD与内标峰面积比

Table 3 Area ratio of 26-OH-PD with the internal standard

标曲实际浓度/ (ng·mL ⁻¹)	标曲 1	标曲 2	标曲 3	标曲 4	标曲 5
S1, 2	0.026	0.023	0.026	0.026	0.027
S2, 5	0.05	0.047	0.049	0.049	0.05
S3, 10	0.088	0.087	0.088	0.088	0.103
S4, 25	0.205	0.206	0.204	0.206	0.199
S5, 50	0.398	0.406	0.398	0.402	0.408
S6, 150	1.173	1.203	1.172	1.186	1.236
S7, 250	1.948	2.001	1.947	1.97	2.148
S8, 500	3.885	3.995	3.883	3.93	4.146

表4 各拟合标准曲线的参数

Table 4 Parameters of the calibration curves

序号	斜率 a	截距 b
标曲 1	0.0078	0.0106
标曲 2	0.008	0.0071
标曲 3	0.0077	0.0105
标曲 4	0.0078	0.0102
标曲 5	0.0082	0.0107
平均值	0.0079	0.0096

表5 用拟合曲线计算出各对照品尿样26-OH-PD的浓度

Table 5 Back-calculated concentration of 26-OH-PD in standard urine samples

标曲实际浓度/(ng·mL ⁻¹)	标曲 1	标曲 2	标曲 3	标曲 4	标曲 5
S1, 2	1.97	1.99	2.01	2.03	1.99
S2, 5	5.05	4.99	5.00	4.97	4.79
S3, 10	9.92	9.99	10.06	9.97	11.26
S4, 25	24.92	24.86	25.13	25.10	22.96
S5, 50	49.67	49.86	50.32	50.23	48.45
S6, 150	149.03	149.49	150.84	150.74	149.43
S7, 250	248.38	249.24	251.49	251.26	260.65
S8, 500	496.72	498.49	502.92	502.54	504.30

标准曲线含8个浓度点， $n=8$ ，共有5条标准曲线，每个浓度在每条标准曲线中各测定1次，共测定5次， $m=5$ ， N 为测定标准尿样溶液的总次数， $N=m \times n=40$ ； a_m 为标准曲线的斜率， b_m 为标准曲线的截距； x_i 为第*i*个标准尿样溶液的浓度， $\bar{x}$ 为8个标准尿样浓度的理论平均值， $\bar{x}=124$ ；*i*为每组对照溶液的序数，*j*为测定尿样标准溶液的序数($j=1, 2, 3 \cdots N$)。

自相关方差为:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 1083288.896$$

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (a_m x_i + b_m)]^2}{N-2}} = 0.0176$$

测定低、中、高浓度质控样品各18次， $P=18$ ，分别得到平均浓度 $\bar{x}_L = 6.16 \text{ ng/mL}$ ， $\bar{x}_M = 97.94 \text{ ng/mL}$ ， $\bar{x}_H = 398.02 \text{ ng/mL}$ ， $\bar{x} = 124 \text{ ng/mL}$ ， $\bar{a} = 0.0079$ ，曲线拟合的标准测量不确定度为:

$$u(x, L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 0.681$$

$$u(x, M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 0.635$$

$$u(x, H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = 0.862$$

相对标准不确定度为:

$$u_r(8, L) = \frac{u(x, L)}{\bar{x}_L} = \frac{0.681}{6.16} = 0.111$$

$$u_r(8, M) = \frac{u(x, M)}{\bar{x}_M} = \frac{0.635}{97.94} = 0.00648$$

$$u_r(8, H) = \frac{u(x, H)}{\bar{x}_H} = \frac{0.862}{398.02} = 0.00217$$

3.3 合成不确定度的评定

26-OH-PD 浓度测定的相对标准不确定度为:

$$u_{c,r} = \sqrt{u_r^2(1) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5) + u_r^2(6) + u_r^2(7) + u_r^2(8)}$$

则 26-OH-PD 质控样品低、中、高浓度的合成相对标准不确定度为: $u_{c,r,L} = 0.117$, $u_{c,r,M} = 0.0356$, $u_{c,r,H} = 0.0277$ 。

低、中、高浓度的标准不确定度为:

$$u_{c,L} = u_{c,r,L} \times \bar{x}_L = 0.117 \times 6.16 = 0.720 \text{ ng / mL}$$

$$u_{c,M} = u_{c,r,M} \times \bar{x}_M = 0.0356 \times 97.94 = 3.487 \text{ ng / mL}$$

$$u_{c,H} = u_{c,r,H} \times \bar{x}_H = 0.0277 \times 398.02 = 11.025 \text{ ng / mL}$$

3.4 扩展不确定度的评定

取 $k=2$, 对应的置信概率为 95%, 26-OH-PD 浓度测定的扩展不确定度为:

$$U_L = k \cdot u_{c,L} = 2 \times 0.720 = 1.44 \text{ ng / mL}$$

$$U_M = k \cdot u_{c,M} = 2 \times 3.487 = 6.97 \text{ ng / mL}$$

$$U_H = k \cdot u_{c,H} = 2 \times 11.025 = 22.05 \text{ ng / mL}$$

3.5 测定结果表示

当置信概率 $P=95\%$ ($k=2$) 时, 尿样中 26-OH-PD 低、中、高浓度质控的测定结果可以分

别表示为 (6.16 ± 1.44) 、 (97.94 ± 6.97) 、 (398.02 ± 22.05) ng/mL。

4 讨论

根据文献报道, 标准曲线和待测样品几乎同时配制, 温度变化很小, 且实验室温度控制在 20°C , 引入的不确定度可忽略, 因此论文未考虑温度变化引入的不确定度。对照品未提供不确定度, 视为真实值, 对照品纯度引入的测量不确定度视为零^[9]。

根据计算出的不确定度分量值, 绘制出各不确定度分量的统计直方图 (图 2)。低浓度不确定度主要影响因素为线性拟合, 提示在进行样品浓度检测时, 为保证低浓度点的准确性, 在遵守国家食品药品监督管理局发布的“化学药物临床药代动力学研究技术指导原则”的前提下选择最佳的标准曲线范围、标准点个数和权重回归方法, 将低浓度点的不确定度降到最小^[10]。中、高浓度的不确定度主要影响因素均为仪器允差, 提示需对仪器定期进行计量和核查, 注意仪器的维护与保养。

通过对 UPLC-MS/MS 法测定尿样中 26-OH-PD 浓度的测量不确定度评定, 为合理改进分析方法提供了可靠依据。通过减小测量结果的不确定度, 使测定结果更加准确可靠, 为建立检测方法提供科学指导。

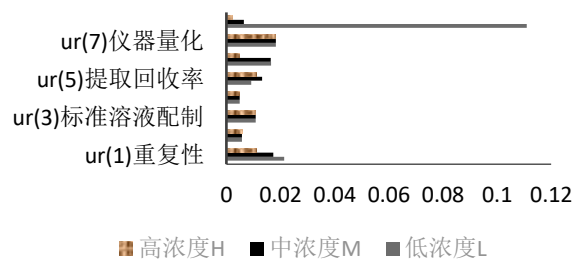


图 2 不确定度分量的统计直方图

Fig. 2 Histogram of the uncertainty components

参考文献

- [1] 谢少斐, 张凤逸, 张含春, 等. LC-MS 法测定大鼠血浆中利可君浓度的不确定度评价 [J]. 中南药学, 2015, 13(8): 802-805.
- [2] 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.
- [3] Lin M, Gao H, Liu J, et al. UPLC-MS/MS determination and pharmacokinetic study of 26-OH-PD in rat plasma [J]. Anal Methods, 2013(5): 6656-6662.

- [4] 林美好, 李平亚, 高红梅, 等. UPLC-MS/MS 法测定大鼠肝微粒体中 26-OH-PD 的含量 [J]. 特产研究, 2015(1): 43-57.
- [5] 林美好. 26-OH-人参二醇的药代动力学研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015: 32.
- [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] 测量不确定度评定与表示 [S]. 2012.
- [8] 化学分析中不确定度的评估指南 [S]. 2006.
- [9] 梅升辉, 杨 莉, 赵志刚, 等. HPLC-MS/MS 法测定人血浆中卡马西平浓度的不确定度评定 [J]. 中国药师, 2016, 19(3): 419-423.
- [10] 严 蓓, 曹国颖, 闫记灵, 等. 高效液相色谱质谱联用法测定人粪便中匹诺塞林浓度的不确定度评定 [J]. 临床药物治疗杂志, 2014, 2(1): 35.