

## LC-MS/MS法测定人血浆中依托考昔浓度的不确定度评定

曹仁智<sup>1</sup>, 咎莹<sup>2</sup>, 刘艳芳<sup>3</sup>, 郭作兵<sup>2\*</sup>

1. 北大医疗鲁中医院 药剂科, 山东 淄博 255000

2. 北大医疗鲁中医院 药物临床试验机构办公室, 山东 淄博 255000

3. 北部战区总医院 临床试验研究室, 辽宁 沈阳 110840

**摘要:** 目的 评价高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法检测人血浆依托考昔浓度的不确定度。方法 采用所建立数学模型对影响人血浆依托考昔浓度测定的因素——重复性、称量、溶液配制、标样配制、样品提取、基质效应、线性拟合、仪器量化等, 进行量化、合成及扩展。结果 置信概率( $P$ )为95%时, 依托考昔低、中、高3质量浓度可分别表示为 $(33.30 \pm 8.61)$ 、 $(322.0 \pm 18.3)$ 、 $(2\ 507 \pm 140)$  ng/mL。结论 人血浆依托考昔浓度测定方法不确定度主要来自线性拟合、溶液配制和基质效应。

**关键词:** 依托考昔; LC-MS/MS; 不确定度; 人血浆

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)12-2621-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.12.014

## Uncertainty evaluation for determination of etoricoxib in human plasma by LC-MS/MS

CAO Renzhi<sup>1</sup>, ZAN Ying<sup>2</sup>, LIU Yanfang<sup>3</sup>, GUO Zuobing<sup>2</sup>

1. Pharmacy Department of PKU Care Luzhong Hospital, Zibo 255000, China

2. GCP Office of PKU Care Luzhong Hospital, Zibo 255000, China

3. Clinical Trail Department, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang 110840, China

**Abstract: Objective** To evaluate the uncertainty of a new method for the determination of etoricoxib in human plasma. **Methods** The mathematical model was established, and used to quantify, synthesize and expand the influence factors including precision, weighing, solution preparation, drug-spiked plasma preparation, extraction process, matrix effect, linear fitting and equipment factor in the whole process of determination of etoricoxib in human plasma by the mathematical model. **Results** When the confidence probability was 95%, the low, medium and high concentrations of etoricoxib in human plasma could be expressed as  $(33.3 \pm 8.61)$ ,  $(322 \pm 18.3)$  and  $(2\ 507 \pm 140)$  ng/mL. **Conclusion** The uncertainty of new method mainly comes from linear fitting, solution preparation and matrix effect.

**Key words:** etoricoxib; LC-MS/MS; uncertainty; human plasma

依托考昔(etoricoxib)是新一代的解热镇痛药,对环氧酶-2具有较高选择性及抑制作用,与传统镇痛药物相比,镇痛效果好,不良反应发生率较低,被广泛用于痛风性关节炎及骨关节炎的治疗<sup>[1-2]</sup>。基于依托考昔人体药动学及生物等效性研究的需要,建立高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定其人血浆浓度的方法。本研究依据JJF1059.1-

2012《测量不确定度评定与表示》<sup>[3]</sup>,中国合格评定国家认可委颁布的CNAS-CL01-G003:2019《测量不确定度的要求》<sup>[4]</sup>和CNAS-GL006:2019《化学分析中不确定度的评估指南》<sup>[5]</sup>,参照已发表文章的方法<sup>[6-10]</sup>,评定所建立人血浆依托考昔浓度测定的不确定度,旨在提高检测质量,实现检测数据的国际互认要求。

收稿日期: 2021-06-09

基金项目: 山东省重点研发计划(2018GSF118130)

第一作者: 曹仁智,男,本科,主管药师,研究方向为临床药学。Tel:(0533)7698306 E-mail:crz1986@163.com

\*通信作者: 郭作兵,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药物临床试验、临床药学。Tel:(0533)7698205 E-mail:guoclzd@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

Waters Acquity TQS 超高效液相色谱串联质谱仪, 美国 Waters 公司; Mettler MS 105 分析天平, mettler 集团; 5804R 低温冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; 药物临床试验管理系统。

### 1.2 试剂与试剂

依托考昔(货号 1-AMZ-76-1, 质量分数 98.0%, Toronto Research Chemicals Inc.); 依托考昔-d3(货号 1-RBO-8-1, 质量分数 98.0%, Toronto Research Chemicals Inc.); 甲醇(货号 UN1230, HPLC 级, MERCK 公司); 超纯水由 Milli Q 型纯水仪(Millipore, USA)制得。

### 1.3 分析条件<sup>[11-12]</sup>

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为水-甲醇(30:70), 体积流量 0.35 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 0.2 μL; ESI 源, 正离子多反应离子监测方式; 毛细管电压 3.0 kV; 离子源温度 150 °C; 脱溶剂气温度 350 °C; 脱溶剂气流量 650 L/h; 碰撞能 28 eV; 扫描时间 100 ms; 定量分析离子对:  $m/z$  359.0/280.1(依托考昔),  $m/z$  362.0/280.2(依托考昔-d3)。

### 1.4 溶液配制

**1.4.1 系列标准溶液** 精密称取依托考昔对照品 10.21 mg, 甲醇定容得 1.00 mg/mL 储备液。精密移取适量储备液后用甲醇逐级稀释, 即得 0.30、1.00、3.00、10.0、30.0、60.0 μg/mL 的系列标准溶液以及质量浓度为 0.6、6.0、48.0 μg/mL 的低、中、高质控溶液。

**1.4.2 内标溶液配制** 称取依托考昔-d3 2.55 mg, 甲醇溶解得 2.50 mg/mL 的内标储备液。精密移取 120 μL 内标储备液用甲醇稀释定容至 100 mL 量瓶中, 得质量浓度为 3 μg/mL 的内标溶液。

### 1.5 校正标样/质控样品的配制

吸取各浓度标准/质量控制溶液 5 μL, 加入 95 μL 人空白血浆, 涡旋 30 s, 即得含依托考昔分别为 15.0、50.0、150.0、500.0、1 500.0、3 000.0 ng/mL 的标准血浆样品以及 30.0 ng/mL(QCL)、300.0 ng/mL(QCM)、2 400 ng/mL(QCH)的质控样品。

### 1.6 血浆样品预处理

取校正标样/质控/待测血浆样品 100 μL 置 1.5 mL 离心管中, 加入 50 μL 内标溶液、500 μL 甲醇, 涡旋 30 s, 4 °C、1 610 × g 离心 10 min, 取上清液进样分析。

### 1.7 数学模型的建立<sup>[13]</sup>

$$y_i = ax_i + b$$

$y_i$  为待测物响应信号与内标响应信号之比;  $a$  为标准曲线斜率;  $b$  为标准曲线截距;  $x_i$  为待测物浓度与内标浓度之比

## 2 不确定度来源分析与评定

### 2.1 不确定度来源分析

测量不确定度: 表征合理地赋予被测量之值的分散性, 与测量结果相联系的参数。测量不确定度一般由若干分量组成, 其中一些分量可根据一系列测量值的统计分布, 按测量不确定度的 A 类评定进行评定, 并用实验标准偏差表征。而另一些分量可根据经验或其他信息假设的概率分布, 按测量不确定度的 B 类评定进行评定, 也可用标准偏差表征。A 类评定指对在规定测量条件下测得的量值, 用统计分析的方法进行的测量不确定度分量的评定, 规定测量条件指重复性测量条件、期间精密度测量条件或复现性测量条件。B 类不确定度评定用不同于测量 A 类评定方法进行的测量不确定度分量的评定<sup>[3]</sup>。

样品测定的每一个步骤都有可能引入不确定度, 本实验测量不确定度来源主要包括操作重复性、称量、溶液配制、提取回收、基质效应、仪器量化、标准曲线拟合等。其中重复性采用 A 类评定, 其他均采用 B 类方法进行评定<sup>[9]</sup>。

### 2.2 不确定度评定

**2.2.1 重复性引入的不确定度 $[U_r(1)]$**  取质控样品 QCL、QCM、QCH 各 6 份, 按“1.6”项下处理后计算质控样品浓度, 重复进行 3 组, 结果见表 1。

依据贝赛尔公式计算依托考昔合并样本偏差:

$$S_{(x,G)} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (X_{jk} - \bar{X}_j)^2}{m(n-1)}}$$

$k$  为每组平行测定次数(1, 2, ...,  $n$ ),  $j$  为组数(1, 2, ...,  $m$ ),  $G$  为组别(L、M、H)

经计算  $S_{(x,L)} = 0.908$  ng/mL,  $S_{(x,M)} = 5.481$  ng/mL,  $S_{(x,H)} = 88.670$  ng/mL。

以每组平均值表示测量结果, 则平均值的标准偏差公式为:

$$S_{(\bar{x}_G)} = \frac{S_{(x,G)}}{\sqrt{mn}}$$

经计算  $S_{(\bar{x}_L)} = 0.2104$  ng/mL,  $S_{(\bar{x}_M)} = 1.293$  ng/mL,

$S_{(\bar{x}_H)} = 20.90$  ng/mL。

测量结果的相对标准不确定度为:  $U_r(1, G) = \frac{S_{(\bar{x}_G)}}{\bar{X}_G}$ , 经计算  $U_r(1, L) = 0.006$ ,  $U_r(1, M) = 0.004$ ,

表1 依托考昔重复测定数据( $n=18$ )  
Table 1 Repeated measurement of etoricoxib concentration ( $n=18$ )

样品编号	依托考昔/(ng·mL <sup>-1</sup> )		
	组1	组2	组3
QCL	33.1	33.9	33.9
	31.2	33.3	32.2
	34.3	34.0	33.3
	32.4	33.8	33.5
	34.2	32.0	32.4
	33.8	33.8	33.5
QCM	308.0	324.0	325.0
	319.0	321.0	326.0
	308.0	325.0	329.0
	328.0	318.0	327.0
	311.0	317.0	334.0
	321.0	317.0	331.0
QCH	2 702.0	2 326.0	2 567.0
	2 466.0	2 424.0	2 486.0
	2 676.0	2 309.0	2 638.0
	2 488.0	2 426.0	2 516.0
	2 712.0	2 308.0	2 606.0
	2 463.0	2 470.0	2 538.0

$U_r(1, H) = 0.008$ 。

**2.2.2** 称量引入的不确定度[ $U_r(2)$ ] 称量过程,天平灵敏度带来的不确定度可忽略不计,依据计量检定证书,所用电子天平精度( $e$ )为0.01 mg。按均匀分布考虑,包含因子( $k$ )= $\sqrt{3}$ ,随机变量半宽( $a$ )= $0.5e$ ,天平的非线性误差为:

$$U(\Delta, \text{nonlinear}) = \frac{a}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = 0.0029 \text{ mg}$$

天平自动调零引起的误差的 $a_0 = a$ ,则天平自动调零引起的误差为:

$$U(\Delta, \text{zeroing}) = \frac{a_0}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = 0.0029 \text{ mg}$$

不考虑重复性误差时,天平的标准不确定度为:

$$U_c(m) = \sqrt{U(\Delta, \text{nonlinear})^2 + U(\Delta, \text{zeroing})^2} = 0.0041 \text{ mg}$$

依托考昔的称量相对标准不确定度为:

$$U_r(2) = \frac{U_c(m)}{m} = \frac{0.0041}{10.21} = 0.0004$$

**2.2.3** 溶液配制引入的不确定度[ $U_r(3)$ ]

①对照品纯度引入的不确定度:按均匀分布处理,其相对标准不确定度如下:

$$U_r(S) = \frac{1 - 98.0\%}{\sqrt{3}} = 0.0115$$

②标准溶液及质控溶液配制过程引入的不确

定度:配制溶液用到的移液枪为Thermo Finn pipette F3移液枪,型号为2~20  $\mu\text{L}$ ( $P_1$ )、10~100  $\mu\text{L}$ ( $P_2$ )、20~200  $\mu\text{L}$ ( $P_3$ )和100~1 000  $\mu\text{L}$ ( $P_4$ ),其容量的最大允差分别为 $\pm 0.2 \mu\text{L}$ 、 $\pm 0.8 \mu\text{L}$ 、 $\pm 1.6 \mu\text{L}$ 和 $\pm 8 \mu\text{L}$ ,2 mL( $P_5$ )、5 mL( $P_6$ )移液管容量最大允差分别为 $\pm 0.01 \text{ mL}$ 和 $\pm 0.015 \text{ mL}$ ;10 mL容量瓶( $V_1$ )和100 mL容量瓶( $V_2$ )最大允差分别为 $\pm 0.020 \text{ mL}$ 和 $\pm 0.10 \text{ mL}$ 。文献报道,标称容量介于给定的2个容量点之间的值,那么它的最大允差以2个容量之间较大容量为标准<sup>[13]</sup>。

$$U_r(P_1) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{0.20}{(\sqrt{3} \times 20)} = 0.0058$$

$$U_r(P_2) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{0.8}{(\sqrt{3} \times 100)} = 0.0046$$

$$U_r(P_3) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{1.6}{(\sqrt{3} \times 200)} = 0.0046$$

$$U_r(P_4) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{8}{(\sqrt{3} \times 1000)} = 0.0046$$

$$U_r(P_5) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{0.01}{(\sqrt{3} \times 2)} = 0.0029$$

$$U_r(P_6) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{0.015}{(\sqrt{3} \times 5)} = 0.0017$$

$$U_r(V) = \frac{a}{(K\bar{X})} = \frac{0.10}{(\sqrt{3} \times 100)} = 0.00057$$

依托考昔系列标准溶液配制过程共使用10 mL容量瓶( $V_1$ )1次,移液枪20~200  $\mu\text{L}$ ( $P_3$ )1次、100~1 000  $\mu\text{L}$ ( $P_4$ )8次,2 mL移液管( $P_5$ )3次。使用储备液配制低、高浓度质控溶液过程使用 $P_2$ 、 $P_4$ 各1次,中浓度质控使用 $P_3$ 、 $P_4$ 各1次。内标浓度不影响样品测定,故标准溶液及质控溶液稀释过程的相对标准不确定度分别为:

$$U_r(STD) = \sqrt{U_r(P_3)^2 + 8U_r(P_4)^2 + 3U_r(P_5)^2 + U_r(V_1)^2} = 0.0148$$

$$U_r(L) = \sqrt{U_r(P_2)^2 + U_r(P_4)^2} = 0.0046$$

$$U_r(M) = \sqrt{U_r(P_3)^2 + U_r(P_4)^2} = 0.0046$$

$$U_r(H) = \sqrt{U_r(P_2)^2 + U_r(P_4)^2} = 0.0046$$

则依托考昔溶液配制整个过程引入的相对标准不确定度为:

$$U_r(3, G) = \sqrt{U_r(S)^2 + U_r(STD)^2 + U_r(G)^2}$$

$$U_r(3, L) = 0.0193, U_r(3, M) = 0.0193, U_r(3, H) = 0.0193$$

**2.2.4** 配制校正标样引入的不确定度[ $U_r(4)$ ] 配制校正标样使用移液器及次数分别为:2~20  $\mu\text{L}$ 移液器1次,20~200  $\mu\text{L}$ 移液器1次,则相对标准不确

定度为:

$$U_r(4) = \sqrt{U_r(P_1)^2 + U_r(P_3)^2} = 0.0087$$

**2.2.5** 样品提取过程引入的不确定度 $[U_r(5)]$  取低、中、高浓度质控样品,每浓度 6 份,按“1.6”项处理后进样,得到与内标的峰面积比值为  $C$ ;取 18 份空白血浆,加入 500  $\mu\text{L}$  甲醇,混匀,4  $^\circ\text{C}$ 、1 450  $\times$  g 离心 10 min,取全部上清液并加入标准溶液和内标溶液使其浓度与质控样品浓度相同,每浓度 6 样本分析,获得相应峰面积比值为  $B$ ,则依托考昔在血浆样本中的提取回收率 =  $C/B$ ,低、中、高 3 种质量浓度质控样品回收率分别为 (115.6  $\pm$  3.66)%、(114.2  $\pm$  1.93)%、(117.6  $\pm$  2.53)%。回收率的相对标准不确定度计算公式为:

$$U_r(5, G) = U_r(RE, G) = \frac{SD_G}{RE_G \sqrt{n}}$$

则依托考昔低、中、高浓度质控样品回收率的相对标准不确定度分别为:  $U_r(5, L) = 0.0129$ ,  $U_r(5, M) = 0.0069$ ,  $U_r(5, H) = 0.0088$ 。

**2.2.6** 基质效应引入的不确定度 $[U_r(6)]$  取处理后基质及空白溶剂配制低、高浓度质控样品,每浓度平行测定 6 次,内标归一化基质效应 = 处理后基质配制样品的峰面积与内标峰面积比值( $A$ )/空白溶

剂配制样品的峰面积与内标峰面积比值( $B$ ),计算得低、高浓度质控样品的基质效应分别为 (97.36  $\pm$  5.95)%和 (97.36  $\pm$  1.45)%。基质效应引入的相对标准测量不确定度计算公式为:

$$U_r(6, G) = U_r(ME, G) = \frac{SD_G}{ME_G \sqrt{n}}$$

则依托考昔低、高浓度质控样品的相对标准不确定度为:  $U_r(6, L) = 0.0249$ ,  $U_r(6, H) = 0.0061$ 。

**2.2.7** 仪器量化引入的不确定度 $[U_r(7)]$  所用液质联用仪为 Waters Acquity TQS,其中质谱定量的最大允差为 2%,液相色谱取样的最大允差为 1%,按均匀分布,仪器量化的相对标准不确定度为:

$$U_r(7) = \sqrt{U_{r\text{质谱}}^2 + U_{r\text{液相}}^2} = \sqrt{\left(\frac{0.02}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0.0129$$

**2.2.8** 线性拟合引入的不确定度 $[U_r(8)]$  本实验标准曲线除零点外有 6 个浓度点,连续测定 6 次,每个样品中依托考昔峰面积与内标峰面积的比值见表 2,经拟合曲线回算校正标样中依托考昔浓度结果见表 3。

用生物样品峰面积比的平均值对浓度以加权最小二乘法进行线性回归(权重  $1/x^2$ )得回归方程,

表 2 依托考昔与内标峰面积比及回归曲线参数

Table 2 Peak area ratio of etoricoxib with internal standard and parameters of calibration curves

质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )	峰面积比值						均值
	1	2	3	4	5	6	
15	0.022 4	0.024 0	0.024 1	0.025 4	0.018 9	0.022 0	0.022 8
50	0.067 3	0.068 3	0.074 8	0.070 6	0.060 4	0.061 9	0.067 2
150	0.200 8	0.197 6	0.214 8	0.209 8	0.181 1	0.189 7	0.199 0
500	0.649 1	0.663 2	0.724 6	0.728 3	0.535 1	0.589 6	0.648 3
1 500	1.929 6	1.923 9	2.243 5	2.211 8	1.690 2	1.824 0	1.970 5
3 000	3.732 1	3.750 9	4.195 3	4.091 5	3.214 5	3.516 4	3.750 1
斜率( $\times 10^{-3}$ )	1.28	1.28	1.45	1.42	1.16	1.16	1.29
截距( $\times 10^{-3}$ )	3.95	3.95	3.25	3.25	3.22	3.22	3.47

表 3 经拟合曲线计算出的每个校正标样中依托考昔的浓度

Table 3 Back-calculated concentration of etoricoxib in standard plasma samples

质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )	质量浓度/(ng·mL <sup>-1</sup> )						均值
	1	2	3	4	5	6	
15	14.37	15.61	14.66	15.58	13.61	16.24	15.01
50	49.39	50.19	50.34	47.39	49.48	50.82	49.60
150	153.59	151.05	148.95	145.39	154.04	161.42	152.41
500	503.26	514.28	507.81	510.43	460.43	507.63	500.64
1 500	1 502.25	1 497.80	1 577.09	1 554.75	1 460.50	1 576.31	1 528.12
3 000	2 908.39	2 923.01	2 951.11	2 878.00	2 780.08	3 041.47	2 913.68

斜率  $a=1.29 \times 10^{-3}$ , 截距  $b=3.47 \times 10^{-3}$ 。每个浓度重复分析的次数为6次,  $m=6$ ; 标准曲线有6个浓度,  $n=6$ ;  $N$ 为测定标准血浆溶液的总次数,  $N=m \times n=36$ , 共测定36次;  $j$ 为测定标准血浆的序数( $j=1, 2, 3, \dots, N$ );  $\bar{x}$ 为6个标准血浆浓度的理论平均值,  $\bar{x}=869 \text{ ng/mL}$ 。

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_j - (a_m x_j + b_m)]^2}{N - 2}} = 0.0167$$

自相关方差为:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 40\,041\,110$$

用本方法测定低、中、高浓度质控样品各18次( $P=18$ ), 得到平均浓度  $\bar{x}_L=33.3 \text{ ng/mL}$ ,  $\bar{x}_M=322 \text{ ng/mL}$ ,  $\bar{x}_H=2\,507 \text{ ng/mL}$ , 其标准不确定度为:

$$U(X_G) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(X_G - \bar{X})^2}{S_{xx}}}$$

$$U(X_L) = 4.114, U(X_M) = 3.905, U(X_H) = 5.024$$

按公式计算依托考昔低、中、高浓度质控样品相对标准不确定度为:

$$U_r(8, G) = \frac{U(X_G)}{\bar{X}_G}$$

$$U_r(8, L) = 0.1237, U_r(8, M) = 0.0121, U_r(8, H) = 0.0020$$

**2.2.9 其他因素引入的不确定度** 本室始终严格控制实验室温度以及每次加液后的混匀, 因此忽略温度及样品不均匀性的影响。

## 2.3 合成不确定度的评定

**2.3.1 标准测量不确定度的合成** 依据不确定度传播律对各相对标准测量不确定度进行合成:

$$U_{x,r} = \sqrt{U_r(1)^2 + U_r(2)^2 + U_r(3)^2 + U_r(4)^2 + U_r(5)^2 + U_r(6)^2 + U_r(7)^2 + U_r(8)^2}$$

则依托考昔质控样品的合成相对标准测量不确定度分别为:  $U_r(L) = 0.129$ ,  $U_r(M) = 0.028$ ,  $U_r(H) = 0.028$ 。

依托考昔质控样品测定的合成标准测量不确定度分别为:

$$U(L) = U_r(L) \times \bar{x}_L = 4.31$$

$$U(M) = U_r(M) \times \bar{x}_M = 9.13$$

$$U(H) = U_r(H) \times \bar{x}_H = 70.2$$

**2.3.2 标准测量不确定度的扩展** 用简易评定方法, 取  $k=2$ , 此时对应的置信概率( $P$ )=95%, 得到扩展不确定度分别为:

$$U_L = k \times U(L) = 8.61$$

$$U_M = k \times U(M) = 18.3$$

$$U_H = k \times U(H) = 140$$

## 2.4 测定结果的表示

人血浆中依托考昔低、中、高浓度质控的测定结果在  $k=2$  ( $P=95\%$ ) 时可以分别表示为  $(33.30 \pm 8.61)$ 、 $(322.0 \pm 18.3)$ 、 $(2\,507 \pm 140) \text{ ng/mL}$ 。

## 2.5 不确定度来源

本研究按照实验过程寻找不确定度的来源, 各不确定度分量的统计直方图见图1, 图中显示线性拟合、溶液配制、基质效应和仪器量化对质控样品不确定度贡献较大。其中对低浓度质控不确定度影响较大的依次为线性拟合、基质效应、溶液配制; 对中浓度质控不确定度影响较大主要为溶液配制、仪器量化、线性拟合; 对中浓度质控不确定度影响较大的为溶液配制、仪器量化、样品提取。

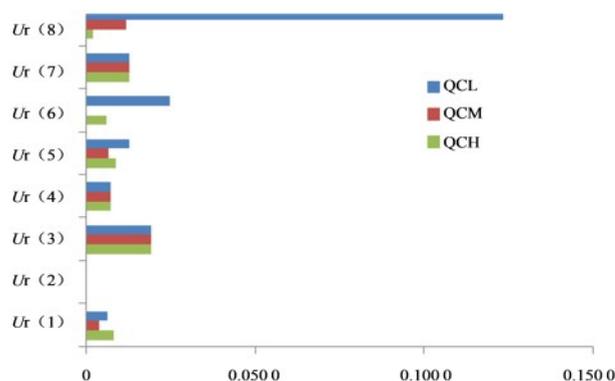


图1 液质联用法测定依托考昔不确定度分量统计直方图  
Fig. 1 Histogram of uncertainty components in etoricoxib determination by LC-MS/MS

## 3 讨论

线性拟合对低浓度样品的不确定度贡献很大, 这与同类文献报道<sup>[6-7]</sup>结论相一致。但由于患者存在药物反应的较大个体差异, 为满足检测目的, 通常设定较大线性范围, 所以在不改变线性范围的情况下, 生物基质药物浓度分析常通过增加标准曲线低浓度点个数(即减小  $\bar{x}$ )和重复测定次数( $m$ ), 以减小低浓度和总体不确定度分量值。

低、高浓度基质效应均为97.36%, 但低浓度基质效应标准偏差(5.95%)较高浓度(1.45%)大, 结果不确定度值差异明显。因此, 除了提高操作的平行性, 也可通过改用其他离子源来降低基质效应, 减小不确定值。因《中国药典》2020版只要求对低、高浓度质控样品进行基质效应考察, 故本研究未将中浓度纳入基质效应的不确定度评价。

溶液以及标样配制过程的不确定度可通过减

小溶液配制体积,或采用允差更小的移液器控制。本实验使用的容量瓶、移液枪、质谱、液相、天平等均定期进行检定/校准及维护,相关不确定度由仪器允差带入。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 佟颖,程自超. 痹宁汤联合依托考昔治疗痛风肾病理效观察[J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(1): 1-4.  
Tong Y, Cheng Z C. Therapeutic effects on gouty nephropathy treated with Bining Decoction and etoricoxib [J]. World J Integr Tradit West Med, 2018, 13(1): 1-4.
- [2] 李荣平,陈琥,谷晓晶,等. 依托考昔与美洛昔康分别联合益赛普及抗风湿药治疗强直性脊柱炎的疗效比较[J]. 中国疼痛医学杂志, 2018, 24(5): 383-385.  
Li R P, Chen H, Gu X J, et al. Comparison of efficacy of etecoxib and meloxicam combined with Yisai in treatment of ankylosing spondylitis [J]. Chin J Pain Med, 2018, 24(5): 383-385.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01-G003: 2019 测量不确定度的要求[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019: 1-6.  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL01-G003: 2019 Requirements for Measurement Uncertainty [S]. Beijing: China Metrology Press, 2019: 1-6.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL006: 2019 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019: 1-139.  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-GL006: 2019 Uncertainty Assessment Guide for Chemical Analysis [S]. Beijing: China Metrology Press, 2019: 1-139.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 测量不确定度评定与表示: JJF 1059.1—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Evaluation and expression of Measurement Uncertainty: JJF 1059.1-2012 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [6] 于思源,冯志平. HPLC-MS/MS法测定人血浆中伏立康唑浓度的不确定度评价[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(1): 94-100.  
Yu S Y, Feng Z P. The uncertainty evaluation of the determination of voriconazole concentrations in human plasma by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Antibiot, 2019, 44(1): 94-100.
- [7] 林美好,张楠淇,王翠竹,等. UPLC-MS/MS测定大鼠血浆中26-OH-人参二醇浓度的不确定度评定[J]. 中南药学, 2018, 16(2): 155-160.  
Lin M Y, Zhang N Q, Wang C Z, et al. Uncertainty in concentration determination of 26-OH-PD in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. Central South Pharm, 2018, 16(2): 155-160.
- [8] 张现化,王德发,周从亚,等. "自下而上"法评定液质联用技术测定人血浆中EVT201浓度的不确定度[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(9): 888-892.  
Zhang X H, Wang D F, Zhou C Y, et al. "Bottom-up" approach to evaluate the measurement uncertainty of EVT201 in human plasma quantifying by UHPLC-MS/MS [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(9): 888-892.
- [9] 安胜男,史爱欣. 生物样本分析实验室不确定度评定方法及在实验室质量控制中的应用[J]. 中国药房, 2016, 27(10): 1426-1429.  
An S N, Shi A X. Method for the evaluation of uncertainty in biological sample analysis laboratory and its applications in laboratory quality control [J]. China Pharm, 2016, 27(10): 1426-1429.
- [10] 史艳军,张冬婕,梅升辉,等. UPLC-MS/MS法测定小鼠血浆尼古丁浓度的不确定度评定[J]. 中南药学, 2020, 18(1): 112-117.  
Shi Y J, Zhang D J, Mei S H, et al. Uncertainty in the determination of nicotine in mouse plasma by UPLC-MS/MS [J]. Central South Pharm, 2020, 18(1): 112-117.
- [11] Raymond R T, Arini S, Dwi N, et al. Pharmacokinetic equivalence study of nonsteroidal anti-inflammatory drug etoricoxib [J]. Clin Pharmacol Ther, 2018, 104: 43-51.
- [12] Zhang X R, Guo N, Ji W, et al. Rapid quantitative analysis of etoricoxib in human plasma by UPLC-MS/MS and application to a pharmacokinetic study in Chinese healthy volunteers [J]. Biomed Chromat, 2018, doi: 10.1002/bmc.4414.
- [13] 李好枝. 体内药物分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.  
Li H Z. Biopharmaceutical Analysis [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007.

【责任编辑 兰新新】