

LC-MS/MS法测定人血浆中氯吡格雷活性代谢物衍生物浓度的不确定度评定^Δ

梅升辉^{1*},冯卫星²,朱乐亭¹,杨莉¹,赵明³,赵志刚^{1#}(首都医科大学附属北京天坛医院药学部,北京100050;2.首都医科大学附属北京天坛医院儿科,北京100050;3.首都医科大学化学生物学与药学院,北京100069)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)23-3206-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.23.13

摘要 目的:评定液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血浆中氯吡格雷活性代谢物衍生物(CAMD)浓度的不确定度。方法:对LC-MS/MS法测定人血浆中CAMD浓度的整个过程进行分析,对测定过程中的测量重复性、称量、工作液配制、生物样品制备、回收率、仪器允差和标准曲线拟合等因素引起的不确定度分别进行了评定,最后计算合成不确定度并进行扩展。结果:血浆CAMD低(0.107 ng/ml)、中(4.467 ng/ml)、高(155.667 ng/ml)质量浓度质控的扩展不确定度分别为0.0102、0.188、6.413 ng/ml($k=2, P=95\%$)。结论:LC-MS/MS法测定人血浆中CAMD的不确定度在低浓度时主要由曲线拟合引入,在中浓度和高浓度时主要由生物样品配制、萃取过程、对照品配制和仪器允差引入。

关键词 氯吡格雷活性代谢物衍生物;液相色谱串联质谱法;血浆;不确定度

Uncertainty Evaluation on Determination of Clopidogrel Active Metabolite Derivative in Human Plasma by LC-MS/MS

MEI Sheng-hui¹, FENG Wei-xing², ZHU Yue-ting¹, YANG Li¹, ZHAO Ming³, ZHAO Zhi-gang¹(1. Dept. of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 2. Dept. of Pediatrics, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China; 3. College of Chemicobiology and Pharmaceutical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the uncertainty of the determination of clopidogrel active metabolite derivative (CAMD) in human plasma by LC-MS/MS. METHODS: The course of CAMD determination in human plasma by LC-MS/MS were analyzed to evaluate the uncertainty caused by evaluate repeatability, weighing, standard solution preparation, biological sample preparation, recovery, instrument precision and calibration curve fitting in CAMD assay; the uncertainty were calculated and expanded. RESULTS: The expanded uncertainty for low (0.107 ng/ml), medium (4.467 ng/ml) and high (155.667 ng/ml) levels of CAMD were 0.0102 ng/ml, 0.188 ng/ml and 6.413 ng/ml, respectively ($k=2, P=95\%$). CONCLUSIONS: The uncertainty of the CAMD determination in human plasma by LC-MS/MS at low concentration is mainly caused by calibration curve fitting; at medium and high concentrations is mainly caused by biological sample preparation, extraction procedure, standard solution preparation and instrument precision.

KEYWORDS Clopidogrel active metabolite derivative; LC-MS/MS; Plasma; Uncertainty

不确定度是表征合理地赋予被测量值的分散性,通过对不确定度来源的分析,可以改进实验方案,提高检测的准确性。氯吡格雷是一种噻吩并吡啶类抗血小板药,国家食品药品监督管理局(CFDA)已经批准了其仿制药的生产^[1],其在体内代谢生成活性产物(R-130964),本试验通过体外烷基化R-130964,建立了液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法测定人血

浆中R-130964衍生物浓度的方法^[2]。本文根据相关的指南^[3-4]对LC-MS/MS法测定人血浆中氯吡格雷活性代谢物衍生物(CAMD)的不确定度进行评定,分析该方法中测量不确定度各分量的来源及大小,为提高检测质量和实现国际间的数据互认提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-20AD液相色谱系统(日本岛津公司);AB QTRAP 5500质谱仪(美国AB公司);Mettler XS 105 DU型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

氯吡格雷活性代谢物衍生物对照品(加拿大TRC公司,批

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81301118);多肽及小分子药物北京市重点实验室开放课题(No.2014DTYW03)

* 药师,博士。研究方向:药物分析。电话:010-67096857。E-mail:meishenghui1983@126.com

通信作者:主任药师,硕士生导师,博士。研究方向:临床药理学、药事管理。电话:010-67098036。E-mail:1022zzg@sina.com

号:4-MNZ-163-3);内标:氯吡格雷类似物(中国食品药品检定研究院,纯度:99.8%);乙腈、乙酸为色谱纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(50 mm × 2.1 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B)(梯度洗脱:0.5 min, 10% A; 1.5 min, 90% A; 3 min, 90% A; 3.1 min, 10% A; 6 min, 10% A);进样量:10 μl;柱温:37 °C。

质谱条件:笔者另文发表。

2.2 对照品溶液的配制

准确称取氯吡格雷活性代谢物衍生物对照品 2.00 mg,用乙腈定容至 5 ml,作为贮备液。取贮备液 2.0 ml,定容至 10 ml,得 10.0 μg/ml 的标准曲线稀释液(A 溶液);取 A 溶液 2.0 ml,定容至 10 ml,得 S9 溶液;取 S9 溶液 5.0 ml,定容至 10 ml,得 S8 溶液;取 S8 溶液 5.0 ml,定容至 10 ml,得 S7;取 S7 溶液 2.0 ml,定容至 10 ml,得 S6 溶液;取 S6 溶液 5.0 ml,定容至 10 ml,得 S5 溶液;取 S5 溶液 2.0 ml,定容至 10 ml,得 S4 溶液;取 S4 溶液 5.0 ml,定容至 10 ml,得 S3 溶液;取 S3 溶液 2.0 ml,定容至 10 ml,得 S2 溶液;取 S2 溶液 5.0 ml,定容至 10 ml,得 S1 溶液。

准确称取内标 5.50 mg,置于 50 ml 量瓶中,定容得 110 μg/ml 内标贮备液。取贮备液 0.5 ml,定容至 50 ml,得 1.1 μg/ml 内标工作液。

2.3 对照品血浆液和质控样品的配制

2.3.1 对照品血浆液 在 EP 管中分别加入系列对照品溶液和内标溶液各 10 μl,加入空白血浆 90 μl,涡旋混匀,加乙腈 300 μl,涡旋 0.5 min, 12 000 × g 离心 2 min,配制成系列对照品血浆液。

2.3.2 质控样品的配制 低、中、高质控样品按“2.3.1”项下方法配制。

2.4 样品分析和标准曲线建立

用质谱检测,以 CAMD 与内标信号面积的比值作为 y 轴,以 CAMD 浓度作为 x 轴,以最小二乘法进行线性拟合。质控样品和未知样品用同样的方法分析后,计算得到 CAMD 浓度。

2.5 数学模型的建立

标准曲线: $y = ax + b$; CAMD 浓度: $x = (y - b)/a$ 。式中, y 为 CAMD 与内标峰面积之比; x 为 CAMD 浓度; a 为回归方程的斜率; b 为截距。

3 测量不确定度评定

3.1 测量不确定度的来源

依据检测方法和操作流程,确定不确定度的来源主要有测量重复性、称量、工作液配制、生物样品制备、萃取过程(回收率)、仪器允差、标准曲线拟合、样品不均匀性、对照品纯度、温度等因素,详见图 1。

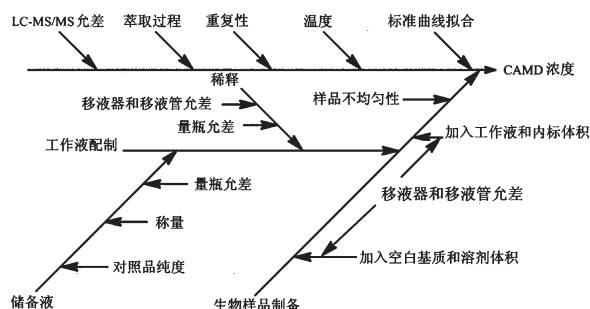


图 1 不确定度来源

Fig 1 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 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$, 并且 CAMD 和内标是在相同温度下测定的, 由于温度对其浓度影响的不同而引入的测量不确定度可忽略。

3.2.2 重复性引起的不确定度(用 A 类评定程序) 将 CAMD 质控低浓度 0.1 ng/ml(L), 中浓度 5 ng/ml(M) 和高浓度 160 ng/ml(H) 样品分为 4 组($m=4$), 每组平行做 5 次($n=5$), 结果见表 1。

根据贝塞尔公式计算每组的标准偏差: $S_j(x) = \sqrt{\sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x})^2 / (n-1)}$ 。式中, k 为每组平行测定次数; j 为组数。计算得 $S_1(x, L) = 0.001 13 \text{ ng/ml}$, $S_2(x, L) = 0.003 67 \text{ ng/ml}$, $S_3(x, L) = 0.000 837 \text{ ng/ml}$, $S_4(x, L) = 0.002 03 \text{ ng/ml}$, 这 20 次测量的标准偏差:

$$S(x, L) = \sqrt{\sum_{j=1}^4 S_j^2(x, L)} / \sqrt{m} = 0.002 21 \text{ ng/ml}$$

以每组 5 个测量值的平均值表示测量结果, 则低浓度组平均值的标准偏差为: $S(\bar{x}_L) = S(x, L) / \sqrt{mn} = 0.002 21 / \sqrt{4 \times 5} = 0.000 495 \text{ ng/ml}$, 低浓度组的均值 $\bar{x}_L = 0.107 \text{ ng/ml}$, 则低浓度组的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(1, L) = u_{\text{rel}}(x, L) = S(\bar{x}_L) / \bar{x}_L = 0.000 495 / 0.107 = 0.004 62$$

$\bar{x}_M = 4.467 \text{ ng/ml}$, $\bar{x}_H = 155.667 \text{ ng/ml}$, 同法计算中、高浓度的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(1, M) = u_{\text{rel}}(x, M) = S(\bar{x}_M) / \bar{x}_M = 0.002 94$$

$$u_{\text{rel}}(1, H) = u_{\text{rel}}(x, H) = S(\bar{x}_H) / \bar{x}_H = 0.003 00$$

表 1 样品重复测定 20 次数据 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Tab 1 The data of repeated determination of samples for 20 times ($\bar{x} \pm s, n=20$)

浓度, ng/ml	组 1, ng/ml	组 2, ng/ml	组 3, ng/ml	组 4, ng/ml
0.1	0.113 ± 0.001 13	0.104 ± 0.003 67	0.113 ± 0.000 837	0.098 8 ± 0.002 03
5	4.314 ± 0.088 3	4.355 ± 0.050 3	4.643 ± 0.028 5	4.550 ± 0.051 5
160	143.084 ± 1.950	163.783 ± 1.980	161.000 ± 2.121	151.800 ± 2.280

3.2.3 天平称量 CAMD 及内标时引入的测量不确定度(用 B 类评定程序) 采用减重法称取 CAMD 2.00 mg 和内标 5.50 mg, 则称量引起的不确定度为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(m) + u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)}$$

式中, 天平的重复性操作、非线性误差和自动调零引起的不确定度分别为 $u(m)$ 、 $u(\Delta)$ 和 $u(\Delta_0)$ 。由于天平的重复性误差已经在重复性试验中评定, 此处不再计算。 $u(\Delta)$ 和 $u(\Delta_0)$ 都按均匀分布, 包含因子 k 取 $\sqrt{3}$, 随机变量半宽 $a = 0.5e$, 天平检定分度值 $e = 0.01 \text{ mg}$, 则

$$u(\Delta) = a/k = 0.5e/\sqrt{3} = 0.5 \times 0.01/\sqrt{3} = 0.002 89 \text{ mg}$$

自动调零作为一次扣皮, 其 $a_0 = a$, 则 $u(\Delta_0) = a_0/k = u(\Delta) = 0.002 89 \text{ mg}$ 。不考虑重复性误差时, 天平的标准不确定度为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = 0.004 08 \text{ mg}$$

不考虑重复性误差时, CAMD(m_1) 和内标(m_2) 的称量相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{\text{rel}}(m_1) = u_c(m) / m_1 = 0.004 08 / 2.00 = 0.002 04$$

$$u_{\text{rel}}(m_2) = u_c(m) / m_2 = 0.004 08 / 5.50 = 0.000 742$$

将称量步骤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:

$$u_{\text{rel}}(2) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(m_1) + u_{\text{rel}}^2(m_2)} = 0.002 17$$

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:试验所用A级量瓶(VB)规格为5、10、50 ml,其最大允差为±0.01 ml、±0.02 ml和±0.05 ml。按三角形分布,包含因子 $\sqrt{6}$,则相对标准测量不确定度为:

$$u_{rel}(VB_{5ml})=a/(k\bar{x})=0.010/(\sqrt{6}\times 5)=0.000817$$

$$u_{rel}(VB_{10ml})=a/(k\bar{x})=0.020/(\sqrt{6}\times 10)=0.000817$$

$$u_{rel}(VB_{50ml})=a/(k\bar{x})=0.050/(\sqrt{6}\times 50)=0.000408$$

(2)吸量管引入的测量不确定度:试验所用A级吸量管(VT)为0.5、2、5 ml,其最大允差分别为±0.005 ml、±0.012 ml和±0.025 ml。按三角形分布,包含因子 $\sqrt{6}$,则相对标准测量不确定度为:

$$u_{rel}(VT_{0.5ml})=a/(k\bar{x})=0.005/(\sqrt{6}\times 0.5)=0.00408$$

$$u_{rel}(VT_{2ml})=a/(k\bar{x})=0.012/(\sqrt{6}\times 2)=0.00245$$

$$u_{rel}(VT_{5ml})=a/(k\bar{x})=0.025/(\sqrt{6}\times 5)=0.00204$$

(3)移液器引入的测量不确定度:试验所用移液器为Eppendorf移液器,型号为2~20 μ l(P_1)、20~200 μ l(P_2)和100~1000 μ l(P_3),其相对最大允差分别为±1.2%、±1.0%和±1.0%。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:

$$u_{rel}(P_1)=a/(k\bar{x})=0.01\times x/(k\bar{x})=0.01/k=0.00490$$

$$u_{rel}(P_2)=a/(k\bar{x})=0.006\times x/(k\bar{x})=0.006/k=0.00408$$

$$u_{rel}(P_3)=a/(k\bar{x})=0.006\times x/(k\bar{x})=0.006/k=0.00408$$

(4)对照品溶液配制引入的测量不确定度:对照溶液稀释最多为10步(包括贮备液配制),使用5 ml量瓶1次,10 ml量瓶10次,2 ml吸量管5次,5 ml吸量管5次;配制内标使用50 ml量瓶2次,0.5 ml吸量管1次。则溶液配制时CAMD和内标(IS)的相对标准测量不确定度为:

$$\begin{aligned} u_{rel}(3, CAMD) &= \sqrt{u_{rel}^2(VB_{5ml})+10u_{rel}^2(VB_{10ml})+5u_{rel}^2(VT_{2ml})+5u_{rel}^2(VT_{5ml})} \\ &= \sqrt{(0.000817^2+10\times 0.000817^2+5\times 0.00245^2+5\times 0.00204^2)} \\ &= 0.00763 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} u_{rel}(3, IS) &= \sqrt{u_{rel}^2(VT_{0.5ml})+2u_{rel}^2(VB_{50ml})} \\ &= \sqrt{(0.00408^2+2\times 0.000408^2)}=0.00412 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} u_{rel}(3) &= \sqrt{u_{rel}^2(3, CAMD)+u_{rel}^2(3, IS)} \\ &= \sqrt{(0.00763^2+0.00412^2)}=0.00867 \end{aligned}$$

(5)配制标准含药样品(ST)和质控样品(QC)时引入的测量不确定度(用B类评定程序):配制ST和QC所用移液器及次数均为2~20 μ l 2次、20~200 μ l 1次和100~1000 μ l 1次。配制ST时的相对标准测量不确定度为:

$$u_{rel}(4, ST)=u_{rel}(4, QC)=\sqrt{2\times u_{rel}^2P_1+u_{rel}^2P_2+u_{rel}^2P_3}$$

$$\begin{aligned} u_{rel}(4) &= \sqrt{u_{rel}^2(4, ST)+u_{rel}^2(4, QC)} \\ &= \sqrt{2\times (2\times 0.00490^2+0.00408^2+0.00408^2)}=0.0128 \end{aligned}$$

3.2.5 液-液萃取过程(用B类评定程序) 回收率(RE)是萃取过程中引入不确定度的主要因素。配制低、中、高浓度的质控样品,同时用乙腈配制与其浓度相同的样品,回收率为质控样品与乙腈配制样品的峰面积比,每组平行做5次,数据见表2。回收率的相对标准测量不确定度为:

$$u_{rel}(5, L)=u_{rel}(RE, L)=\frac{SD_L}{RE\%_{L}\sqrt{n}}=\frac{0.760}{109.000\times\sqrt{5}}=0.00312$$

$$u_{rel}(5, M)=u_{rel}(RE, M)=\frac{SD_M}{RE\%_{M}\sqrt{n}}=\frac{2.620}{106.680\times\sqrt{5}}=0.0110$$

$$u_{rel}(5, H)=u_{rel}(RE, H)=\frac{SD_H}{RE\%_{H}\sqrt{n}}=\frac{2.470}{107.770\times\sqrt{5}}=0.0102$$

表2 CAMD的提取回收率($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab 2 Extraction recovery of CAMD($\bar{x}\pm s, n=5$)

浓度, ng/ml	提取后峰面积	对照品溶液加空白峰面积	回收率, %
0.1(L)	4 577±389	4 200±367	109.000±0.760
5(M)	162 914±3 791	152 723±1 503	106.680±2.620
160(H)	5 053 000±187 340	4 687 620±79 475	107.770±2.470

3.2.6 仪器量化引入的测量不确定度 所用质谱仪为AB QTRAP 5500,液相色谱仪为Shimadzu LC-20AD,质谱仪定量的最大允差为1%,液相色谱仪吸样的最大允差为1%,按均匀分布,则仪器量化的相对标准测量不确定度为:

$$\begin{aligned} u_{rel}(6) &= \sqrt{u_{rel}^2\text{质谱}+u_{rel}^2\text{液相}}=(0.01/\sqrt{3})^2+(0.01/\sqrt{3})^2 \\ &= 0.00817 \end{aligned}$$

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9个浓度的对照品血浆,每个样品CAMD峰面积与内标峰面积的比值(见表3)对CAMD浓度进行线性拟合,权重因子取 $1/x^2$,得到4条标准曲线,斜率和截距见表4;用拟合的标准曲线反算每个对照品血浆的CAMD浓度,详见表5。

表3 CAMD与内标峰面积比

Tab 3 Peak area ratio of CAMD with the internal standard

对照品溶液	浓度, ng/ml	曲线1	曲线2	曲线3	曲线4
S1	0.05	0.00107	0.00118	0.000858	0.000788
S2	0.1	0.00166	0.00171	0.00166	0.00152
S3	0.5	0.00728	0.00857	0.00709	0.00680
S4	1.0	0.0141	0.0157	0.0135	0.0120
S5	5	0.0661	0.0766	0.0570	0.0589
S6	10	0.131	0.148	0.137	0.117
S7	50	0.646	0.712	0.676	0.572
S8	100	1.29	1.43	1.37	1.13
S9	200	2.70	2.77	2.72	2.26

表4 各拟合标准曲线的参数

Tab 4 Parameters of fitted calibration curves

序号	斜率	截距
曲线1	0.0132	0.000400
曲线2	0.0148	0.000312
曲线3	0.0134	0.000218
曲线4	0.0118	0.000231
\bar{x}	0.0133	0.000290

表5 用拟合曲线计算出每个对照品血浆的浓度(ng/ml)

Tab 5 The plasma concentration of substance control calculated by fitted curves(ng/ml)

对照品溶液	浓度, ng/ml	曲线1	曲线2	曲线3	曲线4
S1	0.05	0.0508	0.0584	0.0478	0.0472
S2	0.1	0.0955	0.0945	0.108	0.109
S3	0.5	0.521	0.558	0.513	0.557
S4	1.0	1.04	1.04	0.991	0.997
S5	5	4.98	5.16	4.24	4.97
S6	10	9.89	9.98	10.20	9.90
S7	50	48.9	48.1	50.4	48.5
S8	100	97.7	96.6	102.2	95.7
S9	200	204.5	187.1	203.0	191.5

对照品血浆每个浓度重复分析的次数为4次, $m=4$; 标准曲线有9个浓度, $n=9$; 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号($j=1, 2, 3, \dots, N$); i 为每组对照溶液的序号; a_m 为标准曲线的斜率; b_m 为标准曲线的截距; \bar{x} 为9个标准血浆浓度的理论平均值, $\bar{x}=40.739$; x_i 为第*i*个标准血浆溶液的浓度。

$$\text{残余标准差为: } S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m [y_j - (a_m x_j + b_m)]^2}{N-2}} = 0.000\ 209$$

$$\text{自相关方差为: } S_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 = 145\ 675.524$$

测定低、中、高浓度质控样品各 20 次, $P=20$, 计算得到平均浓度分别为 $\bar{x}_L=0.107\ \text{ng/ml}$, $\bar{x}_M=4.466\ \text{ng/ml}$, $\bar{x}_H=155.667\ \text{ng/ml}$, $\bar{\alpha}=0.0133$, 则质控的标准测量不确定度为:

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

$$= \frac{0.000\ 209}{0.013\ 3} \sqrt{\frac{1}{20} + \frac{1}{36} + \frac{(0.107 - 40.739)^2}{145\ 675.524}} = 0.004\ 69$$

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

$$= \frac{0.000\ 209}{0.013\ 3} \sqrt{\frac{1}{20} + \frac{1}{36} + \frac{(4.466 - 40.739)^2}{145\ 675.524}} = 0.004\ 63$$

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

$$= \frac{0.000\ 209}{0.013\ 3} \sqrt{\frac{1}{20} + \frac{1}{36} + \frac{(155.667 - 40.739)^2}{145\ 675.524}}$$

$$= 0.006\ 45$$

则质控曲线拟合的相对标准测量不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(7, L) = u_{\text{rel}}(x_L) = \frac{u(x_L)}{\bar{x}_L} = 0.001\ 40/0.107 = 0.043\ 8$$

$$u_{\text{rel}}(7, M) = u_{\text{rel}}(x_M) = \frac{u(x_M)}{\bar{x}_M} = 0.009\ 29/4.467 = 0.001\ 04$$

$$u_{\text{rel}}(7, H) = u_{\text{rel}}(x_H) = \frac{u(x_H)}{\bar{x}_H} = 0.752/155.667 = 0.000\ 041\ 4$$

3.2.8 对照品纯度和样品不均匀性引入的测量不确定度 对照品未提供不确定度, 视为真实值, 引入的不确定度为零。样品均为液态并充分混合, 因此样品不均匀性引入的不确定度可忽略不计。

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

依据不确定度传播律对各相对标准测量不确定度进行合成:

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

则 CAMD 质控样品的合成相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{c, \text{rel}}(L) = \sqrt{0.004\ 62^2 + 0.002\ 17^2 + 0.008\ 67^2 + 0.012\ 8^2 + 0.003\ 12^2 + 0.008\ 17^2 + 0.043\ 8^2}$$

$$= 0.047\ 5$$

$$u_{c, \text{rel}}(M) = \sqrt{0.002\ 94^2 + 0.002\ 17^2 + 0.008\ 67^2 + 0.012\ 8^2 + 0.011\ 0^2 + 0.008\ 17^2 + 0.001\ 04^2}$$

$$= 0.021\ 0$$

$$u_{c, \text{rel}}(H) = \sqrt{0.003\ 00^2 + 0.002\ 17^2 + 0.008\ 67^2 + 0.012\ 8^2 + 0.010\ 2^2 + 0.008\ 17^2 + 0.000\ 041\ 4^2}$$

$$= 0.020\ 6$$

CAMD 质控样品测定的合成标准测量不确定度分别为:

$$u_c(L) = u_{c, \text{rel}}(L) \times \bar{x}_L = 0.047\ 5 \times 0.107 = 0.005\ 08$$

$$u_c(M) = u_{c, \text{rel}}(M) \times \bar{x}_M = 0.021\ 0 \times 4.467 = 0.093\ 8$$

$$u_c(H) = u_{c, \text{rel}}(H) \times \bar{x}_H = 0.020\ 6 \times 155.667 = 3.207$$

4.2 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:

$$U_L = k \times u_c(L) = 0.010\ 2$$

$$U_M = k \times u_c(M) = 0.188$$

$$U_H = k \times u_c(H) = 6.413$$

5 测定结果的表示

血浆中 CAMD 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 $(0.107 \pm 0.010\ 2)\ \text{ng/ml}$ 、 $(4.467 \pm 0.188)\ \text{ng/ml}$ 和 $(155.667 \pm 6.413)\ \text{ng/ml}$ 。

6 讨论

本试验检测的是生物样品, 过程比较复杂, 涉及不确定度分量较多, 根据国内外文献[5-6]报道, 其不确定度可估计为正态分布 ($k=2, P=95\%$)。本试验标准曲线浓度范围较大 ($0.05 \sim 200\ \text{ng/ml}$), 标准曲线的拟合过程对于低浓度的不确定度贡献很大, 远大于对中、高浓度的贡献, 因此标准曲线的拟合对低浓度血浆样品的测量很关键。对中、高浓度不确定度影响较大的为生物样品配制、萃取过程、对照溶液配制和仪器精密度 (见图 2)。

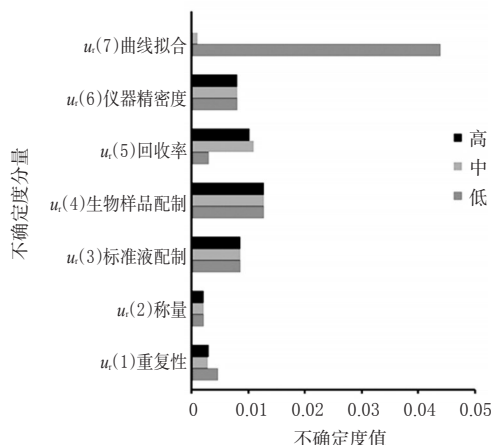


图2 不确定度分量的统计直方图

Fig 2 The statistical histograms of uncertainty components

本研究的不足: 根据文献[1]报道, 不同质控浓度的衍生化效率都在 90% 以上并且稳定, 试验中虽然严格按照操作规程进行, 但是衍生化效率不同必然会引入不确定度, 本文将其忽略。此外, 试验中虽然将温度控制在波动较小的范围内, 但还是有微小的变化, 这也必然引入不确定度, 导致对不确定度的计算偏小。

参考文献

- [1] 郭志刚. FDA 批准了波立维的仿制药[J]. 药品评价, 2014, 11(14): 13.
- [2] Makoto T, Henrianna P, Kiyoshi K, et al. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS[J]. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 48(4): 1 219.
- [3] 国家质量技术监督局计量司. 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2005: 23.
- [4] 施昌彦. 测量不确定度评定与表示指南[M]. 北京: 中国计量出版社, 2005: 32.
- [5] 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.
- [6] 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): 2 884.

(收稿日期: 2015-02-09 修回日期: 2015-07-01)

(编辑: 李 劲)