

# LC-MS/MS法测定人血浆中齐多夫定浓度的不确定度评价

曹国颖<sup>1\*</sup>, 齐文渊<sup>1</sup>, 张 帅<sup>1,2</sup>, 史爱欣<sup>1</sup>, 胡 欣<sup>1</sup>(1. 卫生部北京医院药学部/“药物风险评价与临床个体化用药”北京市重点实验室, 北京 100730; 2. 北京大学医学部药学院, 北京 100091)

中图分类号 R969.1; R978.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)38-3595-05  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.38.14

**摘要** 目的: 评价液-质联用(LC-MS/MS)法测定人血浆中齐多夫定浓度的不确定度。方法: 对齐多夫定浓度测定过程中各影响因素, 包括测定精密度、称量、标准溶液的配制、含药血浆的配制、血浆提取、仪器、标准曲线拟合等进行分析, 计算各变量的不确定度和合成不确定度, 最终计算扩展不确定度。结果: 置信概率 $P$ 为95%时, 血浆低、中、高(25、200、750 ng/ml)质量浓度齐多夫定的扩展不确定度分别为8.54、17.69、81.87 ng/ml。结论: 该方法适用于LC-MS/MS法测定血浆中齐多夫定浓度的不确定度评价, 为复杂生物基质分析过程的不确定度评价提供了参考依据。

**关键词** 齐多夫定; 不确定度; 液-质联用法

## Uncertainty Evaluation for the Determination of Zidovudine Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS

CAO Guo-ying<sup>1</sup>, QI Wen-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Shuai<sup>1,2</sup>, SHI Ai-xin<sup>1</sup>, HU Xin<sup>1</sup>(1. Dept. of Pharmacy, Beijing Hospital, Ministry of Public Health/Beijing Key Laboratory of “Drug Risk Evaluation and Personalized Medication”, Beijing 100730, China; 2. College of Pharmacy, Peking University Health Science Center, Beijing 100091, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To evaluate the uncertainty of the determination of zidovudine concentration in human plasma by LC-MS/MS. METHODS: The various factors influencing the uncertainty in the whole process of determination, including precision, weighing, solution preparation, plasma containing drug preparation, plasma extraction, the apparatus and calibration curves fitting, were all analyzed and estimated. The uncertainty and synthetic uncertainty of each variable were calculated. The expanded uncertainty was analyzed with all the components. RESULTS: When the confidence probability  $P=95\%$ , the expanded uncertainty for low, medium and high (25, 200, 750 ng/ml) concentration of zidovudine were 8.54, 17.69, 81.87 ng/ml, respectively. CONCLUSIONS: This method is suitable for the uncertainty evaluation for the determination of zidovudine concentration in human plasma by LC-MS/MS, and provides reference for uncertainty evaluation of complex biological matrix analysis.

**KEYWORDS** Zidovudine; Uncertainty; LC-MS/MS

表2 艾普拉唑 PPK 模型参数

Tab 2 Population pharmacokinetic parameter of ilaprazole

| 参数             | 估算值      | RSD, % |
|----------------|----------|--------|
| 药动学参数          |          |        |
| CL/F, L/h      | 2.74     | 12.3   |
| V/F, L         | 12.6     | 15.2   |
| K <sub>a</sub> | 0.361    | 18.6   |
| Gama           | 2.19     | 6.8    |
| GEN CL         | 0.881    | 4.6    |
| 个体间变异          |          |        |
| CL/F, L/h      | 11.5     | 26.2   |
| K <sub>a</sub> | 47.6     | 39.1   |
| 残差变异           |          |        |
| 百分比, %         | 78.5     | 13.6   |
| 附加项            | 0.003 16 | -      |

注: Additive 的 RSD 数值太小可忽略

Note: The RSD of Additive is too small to be ignored

在目标适应证受试者体内的药动学行为, 提示临床用药时无需根据上述因素调整药物。

## 参考文献

[1] 刘新光. 2011年度中国消化病学研究进展[J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2011, 3(6): 36.

\* 主任药师, 硕士。研究方向: 医院药学。电话: 010-85133631。

E-mail: caogy\_10@126.com

- [2] 廖斌, 丛欣, 廖清江. 2008年全球上市的新药[J]. 药学进展, 2009, 33(5): 235.
- [3] 王强, 童强, 金曙, 等. 艾普拉唑治疗幽门螺杆菌阳性十二指肠溃疡的临床研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009(9): 1 307.
- [4] 梁建华, 张石革. 质子泵抑制剂的研究进展与临床应用[J]. 中国药房, 2002, 13(1): 51.
- [5] 边壮, 田琳, 高敏照, 等. 珠海市部分医院使用艾普拉唑肠溶片的安全性评价[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(17): 1 440.
- [6] 贾运涛, 蒋兴华. 群体药动学理论及其应用[J]. 中国药房, 2004, 15(1): 50.
- [7] 牟静, 何秋毅, 傅晓华, 等. 肾移植患者西罗莫司的群体药动学研究[J]. 中国药房, 2012, 23(10): 886.
- [8] 焦洋, 廖建湘, 焦正, 等. 卡马西平在癫痫患儿中的群体药动学研究[J]. 中国药房, 2011, 22(30): 2 819.
- [9] 刘旋, 壹丽安. 中国第一个为你命名[J]. 中国处方药, 2008(7): 40.
- [10] 梁嘉碧, 冯文周, 边壮, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中艾普拉唑的浓度[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(6): 935.

(收稿日期: 2014-04-29 修回日期: 2014-05-29)

不确定度是表征合理地赋予被测量之值的分散性,是与测量结果相联系的参数。建立和实施检测的不确定度评定方法,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。齐多夫定是一种抗病毒药,用于艾滋病或与艾滋病有关的综合征及免疫缺陷病毒(HIV)感染患者的治疗。本文对液-质联用(LC-MS/MS)法测定人血浆中齐多夫定浓度的不确定度进行了评价,探讨了复杂生物基质中药物浓度测定的不确定度评定方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters Quattro Premier LC-MS/MS 仪(美国 Waters 公司); Masslynx 4.0 数据处理系统(美国 Waters 公司); VORTEX-5 涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Thermo SORVAIL 高速离心机(美国 Thermo 公司,离心半径:85 mm); XP205 分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司;超低温冰箱(美国 Thermo 公司); Thermo Scientific SPD2010 型离心浓缩系统。

### 1.2 药品与试剂

齐多夫定对照品(中国药品生物制品检定研究院,批号:100672-200401,纯度:98%);内标:格列吡嗪对照品(上海制药厂,批号:9801003,含量:99.7%);甲醇、醋酸铵为色谱纯;超纯水(18.2 MΩ·cm,25 ℃)由 Milli-Q®A10 Synthesis 纯化系统(美国 Millipore 公司)制备;方法学研究用的健康人空白血浆由北京通州血液中心健康受试者提供。

## 2 方法<sup>[1-4]</sup>

### 2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Symmetry C<sub>18</sub>(100 mm×2.1mm,3.5 μm);流动相:4 mmol/L 的醋酸铵(A)-甲酸(B),梯度洗脱程序见表 1;自动进样器温度:4 ℃。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 The mobile phase of zidovudine

| 时间,min | A,% | B,% | 流速,ml/min |
|--------|-----|-----|-----------|
| 0      | 90  | 10  | 0.4       |
| 1.0    | 90  | 10  |           |
| 1.2    | 0   | 100 |           |
| 4.5    | 0   | 100 |           |
| 4.8    | 90  | 10  |           |
| 6.0    | 90  | 10  |           |

电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,毛细管电压:3.0 kV,锥孔电压:20 V;源温度:120 ℃;脱溶剂气温:450 ℃;脱溶剂气流量:500 L/h;锥孔气流量:50 L/h;齐多夫定与内标格列吡嗪的检测离子对分别为: $m/z$  268.1/126.8(锥孔电压 22 V)和  $m/z$  446.2/321.1(锥孔电压 20 V)。

### 2.2 溶液配制

2.2.1 齐多夫定标准工作液:准确称取齐多夫定对照品 10.0 mg,置于 50 ml 量瓶中,以 50% 甲醇溶液[甲醇-水(1:1, V/V)]溶解并稀释定容至刻度,得到 200 μg/ml 的齐多夫定标准母液。精密吸取齐多夫定标准母液 400 μl,置于 1.5 ml EP 管中,加入 50% 甲醇溶液 400 μl 稀释,配制为 100 μg/ml 的齐多夫定标准工作液(Sw),储存于 4 ℃ 冰箱备用。

2.2.2 内标格列吡嗪标准工作液:准确称取格列吡嗪对照品 10.0 mg,置于 50 ml 量瓶中,用甲醇溶解后,再用 50% 甲醇溶

液稀释定容至刻度,得 200 μg/ml 的内标母液;再用 50% 甲醇溶液稀释成 80 ng/ml 内标溶液,储存于 4 ℃ 冰箱备用。

2.2.3 齐多夫定质控样本:准确称取齐多夫定对照品 10.0 mg,置于 50 ml 量瓶中,以 50% 甲醇溶液溶解并稀释定容至刻度,得到 200 μg/ml 的齐多夫定质控母液。精密吸取齐多夫定质控母液 300 μl,置于 EP 管中,加入 50% 甲醇溶液 500 μl 稀释,配制为 75 μg/ml 的齐多夫定质控工作液(Qw)。

2.2.4 血浆标准曲线的制备:齐多夫定血浆标准曲线的质量浓度范围 10~1 000 ng/ml(配制方法见表 2)。

表 2 齐多夫定血浆标准曲线溶液配制方法

Tab 2 The preparation of calibration curves of zidovudine plasma samples

| 步骤 | 溶液 | 取出体积, μl | 空白血浆, μl | 溶液名称 | 质量浓度, ng/ml | 剩余体积, μl |
|----|----|----------|----------|------|-------------|----------|
| 1  | Sw | 15       | 1 485    | S8   | 1 000       | 615      |
| 2  | S8 | 375      | 125      | S7   | 750         | 500      |
| 3  | S8 | 300      | 300      | S6   | 500         | 550      |
| 4  | S8 | 150      | 450      | S5   | 250         | 550      |
| 5  | S8 | 60       | 540      | S4   | 100         | 500      |
| 6  | S6 | 50       | 450      | S3   | 50          | 500      |
| 7  | S5 | 50       | 450      | S2   | 25          | 500      |
| 8  | S4 | 50       | 450      | S1   | 10          | 500      |

2.2.5 齐多夫定血浆质控样品的制备:齐多夫定血浆质控样品浓度为 25、200、750 ng/ml(具体配制方法见表 3)。

表 3 齐多夫定质控溶液的稀释方法

Tab 3 Dilution method of zidovudine quality control solution

| 步骤 | 溶液 | 取出体积, μl | 空白血浆, μl | 溶液名称 | 浓度, ng/ml | 剩余体积, μl |
|----|----|----------|----------|------|-----------|----------|
| 1  | Qw | 10       | 990      | Q3   | 750       | 760      |
| 2  | Q3 | 240      | 660      | Q2   | 200       | 760      |
| 3  | Q2 | 100      | 700      | Q1   | 25        | 800      |

### 2.3 血浆样品预处理

采用液-液萃取方法对血浆样本进行处理。1.5 ml 离心管中依次加入血浆样本 100 μl、内标溶液(80 ng/ml)50 μl 和乙酸乙酯溶液 1 ml,涡旋振荡 80 次(点振)后,离心(13 000 r/min)5 min,取上清液 900 μl,减压浓缩(60 ℃)50 min 后挥干,残渣用的 50% 甲醇溶液 200 μl 复溶,涡旋混匀 2 min,离心(13 000 r/min)5 min,吸取上清液 100 μl 转移至进样瓶中。

### 2.4 样品检测与计算

采用 LC-MS/MS 法进行样品的测定,以齐多夫定信号的峰面积与内标响应的峰面积之比对样品浓度作标准曲线,以最小二乘法进行线性拟合。待测样品用同样的方法分析后,将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,计算得到待测样品的浓度,即:

$$c = \frac{R - B_0}{B_1}$$

其中  $R$  为齐多夫定信号峰面积与内标信号峰面积之比,  $B_1$  为标准曲线斜率,  $B_0$  为标准曲线截距。

## 3 结果

### 3.1 测量不确定度的来源分析

生物样本中药物测定步骤包括:(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贮备液配制(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(影响因素包括容量瓶、移液器允差)的

影响,加入空白血浆和内标受移液器允差影响;(2)样品的提取:涉及回收率问题;(3)仪器测定;(4)标准曲线的拟合;(5)温度等。这些步骤中的每一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。

### 3.2 各分量不确定度的分析和评定

3.2.1 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“2.2.4”项方法分别配制10、25、50、100、200、500、750、1 000 ng/ml的标准血浆,并配制200 ng/ml样品5份( $n=5$ ),按“2.3”项方法处理后进样,进行LC-MS/MS测定。将样品与内标峰面积比( $R$ )对样品的浓度( $c$ )进行线性回归,得到标准曲线方程,将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方程,计算得到200 ng/ml样品的实测质量浓度。一共重复进行3组( $n=5$ )这样的配制和测定,结果见表4。

表4 齐多夫定重复测定质量浓度数据

Tab 4 Repeated measurement concentration data of zidovudine

| 第1组         | 质量浓度,ng/ml | 第2组         | 质量浓度,ng/ml | 第3组         | 质量浓度,ng/ml |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|
| $x_{11}$    | 202.3      | $x_{21}$    | 202.3      | $x_{31}$    | 172.0      |
| $x_{12}$    | 197.1      | $x_{22}$    | 202.2      | $x_{32}$    | 209.5      |
| $x_{13}$    | 175.1      | $x_{23}$    | 191.9      | $x_{33}$    | 187.6      |
| $x_{14}$    | 191.0      | $x_{24}$    | 195.7      | $x_{34}$    | 179.1      |
| $x_{15}$    | 197.7      | $x_{25}$    | 198.7      | $x_{35}$    | 199.0      |
| $\bar{x}_1$ | 192.64     | $\bar{x}_2$ | 198.16     | $\bar{x}_3$ | 189.44     |

依据贝赛尔公式计算合并样本偏差:

$$S_p(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{k=1}^m (x_{ik} - \bar{x}_i)^2}{m(n-1)}} = 10.94 \text{ ng/ml}$$

公式中, $m$ 为测量组数, $n$ 为每组的测量次数(本试验 $m=3, n=5$ ); $k$ 为每组平行测定份数(1, 2, ...,  $n$ ), $j$ 为组数(1, 2, ...,  $m$ )。

以每组5个值得平均值表示测量结果,则平均值的标准偏差为:

$$S_p(\bar{x}) = \frac{S_p(x)}{\sqrt{mn}} = \frac{10.94}{\sqrt{3 \times 5}} = 2.82$$

则测量结果的相对标准不确定度为:

$$u_r(1, \text{mid}) = u_r(x, \text{mid}) = \frac{S_p(\bar{x}, \text{mid})}{\bar{x}_{\text{Total}}} = \frac{2.82}{193.41} = 0.015$$

同样的方法计算低(25 ng/ml)、高(750 ng/ml)质量浓度的相对标准不确定度分别为:

$$u_r(1, \text{low}) = \frac{S_p(\bar{x}, \text{low})}{\bar{x}_{\text{Total}}} = 0.015$$

$$u_r(1, \text{high}) = \frac{S_p(\bar{x}, \text{high})}{\bar{x}_{\text{Total}}} = 0.013$$

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。依据计量检定证书,所用电子天平 $e=0.1 \text{ mg}$ ,按均匀考虑,天平的非线性误差为:

$$u(\Delta, \text{Nonlinear}) = \frac{a}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}} = \frac{0.5 \times 0.1}{\sqrt{3}} = 0.029 \text{ mg}$$

天平自动调零作为一次扣皮,其 $a_0=a$ ,则天平自动调零引起的误差为:

$$u(\Delta, \text{Zeroing}) = a_0/k_0 = 0.029 \text{ mg}$$

不考虑重复性误差时,天平的标准不确定度为:

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(\Delta, \text{Nonlinear}) + u^2(\Delta, \text{Zeroing})} = \sqrt{0.029^2 + 0.029^2} = 0.041 \text{ mg}$$

称量齐多夫定和内标的质量均为10.0 mg,不考虑重复性误差时,称量齐多夫定的相对标准不确定度为 $u_r(m_1) = \frac{u_c(m)}{m_1} = \frac{0.041}{10} = 0.0041$ ,称量内标的相对标准不确定度为 $u_r(m_2) = \frac{u_c(m)}{m_2} = \frac{0.041}{10} = 0.0041$ ( $m_1$ 为标准品齐多夫定称量, $m_2$ 为内标的称量)。

称量引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(2) = \sqrt{u_r^2(m_1) + u_r^2(m_2)} = \sqrt{0.0041^2 + 0.0041^2} = 0.0058$$

(2)配制标准溶液和血浆标准曲线时引入的不确定度[ $u_r(3)$ ]:配制贮备液所用容量瓶为50 ml量瓶,其最大允许误差为 $\pm 0.05 \text{ ml}$ 。按均匀分布,量瓶(Volumetric flask, VF)的相对标准不确定度为:

$$u_r(x, \text{VF}) = \frac{a}{k\bar{x}} = \frac{0.05}{\sqrt{3} \times 50} = 0.00058$$

配制标准溶液时用到移液器,移液器为Transferringette®S手动半支消毒移液器(Brande,德国),按厂商提供的技术参数,量程范围是100~1 000  $\mu\text{l}$ 的移液器的最大允许误差为 $\pm 0.6\%$ ,量程范围是10~100  $\mu\text{l}$ 的移液器的最大允许误差为 $\pm 0.6\%$ ,量程范围是2~20  $\mu\text{l}$ 的移液器的最大允许误差为 $\pm 0.8\%$ 。由于温度对移液器的影响非常小,忽略不计。按均匀分布,移液器(Pipet, P)的相对标准不确定度为:

$$u_r(x, P_1) = \frac{a_1}{k\bar{x}_1} = \frac{0.006 \times \bar{x}}{k\bar{x}} = \frac{0.006}{k} = \frac{0.006}{\sqrt{3}} = 0.0035$$

$$u_r(x, P_2) = \frac{a_2}{k\bar{x}_2} = \frac{0.006 \times \bar{x}}{k\bar{x}} = \frac{0.006}{k} = \frac{0.006}{\sqrt{3}} = 0.0035$$

$$u_r(x, P_3) = \frac{a_3}{k\bar{x}_3} = \frac{0.008 \times \bar{x}}{k\bar{x}} = \frac{0.008}{k} = \frac{0.008}{\sqrt{3}} = 0.0046$$

不考虑重复性误差,考虑到操作次数时,配制溶液引入的对标准不确定度为:

$$u_r(3) = \sqrt{3 \cdot u_r^2(x, \text{VF}) + 15 \cdot u_r^2(x, P_1) + 5 \cdot u_r^2(x, P_2) + 3 \cdot u_r^2(x, P_3)} = \sqrt{3 \times 0.00058^2 + 15 \times 0.0035^2 + 5 \times 0.0035^2 + 3 \times 0.0046^2} = 0.018$$

(3)血浆样品提取过程引入的不确定度[ $u_r(4)$ ]:25、200、750 ng/ml的血浆质控样本,每种样本每个浓度各6份,按“2.3”项方法处理后进样,得到峰面积设为 $C$ ;另取6份来自于不同个体的空白血浆适量,按“2.3”项方法处理后,加入齐多夫定标准工作液适量分别配制成25、200、750 ng/ml的样本溶液后进样,得到峰面积设为 $B$ ,计算齐多夫定和内标在血浆样本中的提取回收率 $= C/B \times 100\%$ ,结果见表5。

回收率的相对标准不确定度为:

$$u_r(4, \text{low}) = u_r(R, \text{low}) = \frac{SD_{\text{low}}}{R_{\text{low}} \sqrt{n}} = \frac{7.01}{86.51 \times \sqrt{6}} = 0.033$$

$$u_r(4, \text{mid}) = u_r(R, \text{mid}) = \frac{SD_{\text{mid}}}{R_{\text{mid}} \sqrt{n}} = \frac{7.01}{76.47 \times \sqrt{6}} = 0.037$$

表5 提取回收率试验结果(n=6)

Tab 5 Results of extraction recovery(n=6)

| 理论浓度, ng/ml | C (n=6) | B (n=6) | 提取回收率, 平均回收率, 标准偏差(SD), % |       |      |
|-------------|---------|---------|---------------------------|-------|------|
| 25          | 611.2   | 620.7   | 98.47                     | 86.51 | 7.01 |
|             | 592.4   | 734.5   | 80.65                     |       |      |
|             | 550.7   | 660.5   | 83.38                     |       |      |
|             | 626.6   | 702.0   | 89.26                     |       |      |
|             | 607.3   | 691.3   | 87.85                     |       |      |
|             | 558.5   | 702.7   | 79.48                     |       |      |
| 200         | 4 497   | 5 225   | 86.07                     | 76.47 | 7.01 |
|             | 4 447   | 5 614   | 79.21                     |       |      |
|             | 4 114   | 5 959   | 69.04                     |       |      |
|             | 4 350   | 6 363   | 68.36                     |       |      |
|             | 4 568   | 6 100   | 74.89                     |       |      |
|             | 4 686   | 5 769   | 81.23                     |       |      |
| 750         | 15 516  | 23 454  | 66.16                     | 78.28 | 9.38 |
|             | 18 554  | 20 907  | 88.75                     |       |      |
|             | 17 271  | 23 195  | 74.46                     |       |      |
|             | 19 407  | 22 612  | 85.83                     |       |      |
|             | 18 135  | 21 420  | 84.66                     |       |      |
|             | 14 067  | 20 144  | 69.83                     |       |      |

$$u_r(4, \text{high}) = u_r(R, \text{high}) = \frac{SD_{\text{high}}}{R_{\text{high}} \sqrt{n}} = \frac{9.38}{78.28 \times \sqrt{6}} = 0.049$$

(4) HPLC 量化测量引入的不确定度[u.(5)]: 峰面积测定所用仪器为 Waters Quattro Premier LC-MS/MS(美国 Waters 公司), 其定量的最大允差为 1%, 按均匀分布, 其相对不确定度为:

$$u_r(5) = \frac{1}{100 \times \sqrt{6}} = 0.0058$$

(5) 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。

(6) 线性回归过程引入的不确定度[u.(6)]: 生物样本中药物质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 1 000、750、500、250、100、50、25、10 ng/ml 的标准血浆样品, 提取后检测, 每个浓度测量 4 次, 共测得 32 对值(见表 6)。用每个标准血浆 R 的平均值对质量浓度以加权最小二乘法进行线性回归, 得标准曲线方程, 斜率和截距见表 7。标准曲线各质量浓度点实测值见表 8。

表6 齐多夫定与内标峰面积比值(n=3)

Tab 6 Peak area ratio of zidovudine and internal standard (n=3)

| 浓度, ng/ml | R=A/A <sub>i</sub> |       |       |       | $\bar{x}$ |
|-----------|--------------------|-------|-------|-------|-----------|
|           | 1                  | 2     | 3     | 4     |           |
| 10        | 0.024              | 0.056 | 0.022 | 0.016 | 0.030     |
| 25        | 0.066              | 0.143 | 0.071 | 0.039 | 0.080     |
| 50        | 0.12               | 0.281 | 0.141 | 0.083 | 0.156     |
| 100       | 0.186              | 0.540 | 0.195 | 0.17  | 0.273     |
| 250       | 0.581              | 1.436 | 0.572 | 0.413 | 0.751     |
| 500       | 1.068              | 2.868 | 1.209 | 0.883 | 1.507     |
| 750       | 1.855              | 4.225 | 1.863 | 1.128 | 2.268     |
| 1 000     | 2.528              | 5.589 | 2.588 | 1.727 | 3.108     |

表7 各拟合标准曲线的参数

Tab 7 The parameters of fitted calibration curves

| 序号 | 斜率 a     | 截距 b      |
|----|----------|-----------|
| 1  | 0.002 50 | -0.035 5  |
| 2  | 0.005 60 | 0.007 8   |
| 3  | 0.002 60 | -0.026 2  |
| 4  | 0.001 70 | -0.001 4  |
| 均值 | 0.003 10 | -0.013 83 |

表8 实测每个标准血浆的质量浓度

Tab 8 Measured plasma concentrations of each standard sample

| 理论质量浓度, ng/ml | 实测质量浓度, ng/ml |       |         |       |
|---------------|---------------|-------|---------|-------|
|               | 1             | 2     | 3       | 4     |
| 10            | 9.8           | 10.0  | 8.9     | 9.9   |
| 25            | 27.2          | 25.3  | 28.4    | 23.6  |
| 50            | 49.9          | 49.8  | 55.8    | 50.2  |
| 100           | 77.2          | 96.0  | 77.2    | 102.0 |
| 250           | 241.5         | 254.9 | 226.0   | 248.1 |
| 500           | 444.1         | 509.4 | 477.0   | 529.8 |
| 750           | 771.1         | 750.3 | 734.5   | 676.9 |
| 1 000         | 1 050.8       | 992.6 | 1 020.6 | 1 036 |

8 个标准血浆排序为  $i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (m=8)$ ; 每个标准血浆测量 4 次的排序为  $j=1, 2, 3, 4 (n=4)$ 。

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [y_j - (a_n x_j + b_n)]^2}{N-2}} = 0.0367$$

自相关方差为

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2 = 4051133.34$$

本试验测定了 25、200、750 ng/ml 的血浆样品各 15 次, 得到平均质量浓度分别为  $\bar{x}_{\text{low}}=24.46$  ng/ml,  $\bar{x}_{\text{mid}}=193.41$  ng/ml,  $\bar{x}_{\text{high}}=747.81$  ng/ml。其标准不确定度分别为:

$$u_r(x, \text{low}) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{\text{low}} - \bar{x}_{\text{Total}})^2}{S_{xx}}} = \frac{0.0367}{0.0031} \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{32} + \frac{(24.46 - 335.625)^2}{405133.34}} = 4.1298$$

$$u_r(x, \text{mid}) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{\text{mid}} - \bar{x}_{\text{Total}})^2}{S_{xx}}} = \frac{0.0367}{0.0031} \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{32} + \frac{(193.41 - 335.625)^2}{405133.34}} = 3.7958$$

$$u_r(x, \text{high}) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_{\text{high}} - \bar{x}_{\text{Total}})^2}{S_{xx}}} = \frac{0.0367}{0.0031} \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{32} + \frac{(747.81 - 335.625)^2}{405133.34}} = 4.4250$$

公式中  $P$  为测定  $x$  的总次数 ( $P=15$ );  $N$  为测定标准血浆的总次数 ( $N=m \times n=8 \times 4=32$ );  $J$  为测定标准血浆的序数 ( $J=1, 2, 3 \dots N$ ),  $J$  与  $j$  不同;  $i$  为标准血浆的序数 ( $i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$ );  $\bar{x}$  为每组中实测 8 个血浆样品浓度的平均值;  $\bar{x}_{\text{Total}}$  为  $m=8$  个理论标准血浆浓度的平均值;  $x_i$  为每组中第  $i$  个标准血浆的实测浓度;  $a_n$  为每组标准曲线的斜率;  $b_n$  为每组标准曲线的截距。

则其相对标准不确定度分别为:

$$u_r(6, \text{low}) = u_r(x_{\text{low}}) = \frac{u(x, \text{low})}{\bar{x}_{\text{low}}} = 4.1298/24.46 = 0.1688$$

$$u_r(6, \text{mid}) = u_r(x_{\text{mid}}) = \frac{u(x, \text{mid})}{\bar{x}_{\text{mid}}} = 3.7958/193.41 = 0.0196$$

$$u_r(6, \text{high}) = u_r(x_{\text{high}}) = \frac{u(x, \text{high})}{\bar{x}_{\text{high}}} = 4.4250/747.81 =$$

0.0059

### 3.3 合成不确定度的评定

齐多夫定浓度测定的相对标准不确定度为:

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

得齐多夫定低、中、高浓度的合成相对标准不确定度分别为:

$$u_{c,r,\text{low}} = \sqrt{0.015^2 + 0.0058^2 + 0.018^2 + 0.033^2 + 0.0058^2 + 0.1688^2} = 0.1746$$

$$u_{c,r,\text{mid}} = \sqrt{0.015^2 + 0.0058^2 + 0.018^2 + 0.037^2 + 0.0058^2 + 0.0196^2} = 0.0457$$

$$u_{c,r,\text{high}} = \sqrt{0.013^2 + 0.0058^2 + 0.018^2 + 0.049^2 + 0.0058^2 + 0.0059^2} = 0.0547$$

齐多夫定低、中、高浓度测定的标准不确定度为:

$$u_{c,\text{low}} = u_{c,r,\text{low}} \times \bar{x}_{\text{low}} = 0.1746 \times 24.46 = 4.271 \text{ ng/ml}$$

$$u_{c,\text{mid}} = u_{c,r,\text{mid}} \times \bar{x}_{\text{mid}} = 0.0457 \times 193.41 = 8.843 \text{ ng/ml}$$

$$u_{c,\text{high}} = u_{c,r,\text{high}} \times \bar{x}_{\text{high}} = 0.0547 \times 747.81 = 40.934 \text{ ng/ml}$$

### 3.4 扩展不确定度的评定

取  $k=2$ , 此时对应的置信概率为 95.45%, 齐多夫定浓度测定的扩展不确定度为:

$$U_{\text{low}} = k \times u_{c,\text{low}} = 2 \times 4.271 = 8.54 \text{ ng/ml}$$

$$U_{\text{mid}} = k \times u_{c,\text{mid}} = 2 \times 8.843 = 17.69 \text{ ng/ml}$$

$$U_{\text{high}} = k \times u_{c,\text{high}} = 2 \times 40.934 = 81.87 \text{ ng/ml}$$

### 3.5 测定结果的表示

人血浆中齐多夫定低、中、高浓度的测定结果可分别表示为  $(24.46 \pm 8.54)$ 、 $(193.41 \pm 17.69)$ 、 $(747.81 \pm 81.87)$  ng/ml。  $k=2 (P=95\%)$ 。

## 4 讨论

按照试验的顺序逐步寻找不确定度的来源, 即从标准血浆的制备、样品的提取、仪器测定、标准曲线的拟合过程中分析不确定度的来源。本报告重点考虑上述过程中的测量重复性(精密度)、称量对照品、配制标准溶液、液-液萃取回收率、仪器量化、线性回归等因素。试验环境在空调条件下(温度控制恒定), 且齐多夫定和内标是在相同温度下配制和测定, 故温度对于二者浓度的影响忽略不计; 由于标准溶液和血浆均为液态样品, 标准溶液在容量瓶中充分混匀, 含药血浆样品体积小且用涡旋振荡器充分混合 2 min, 所以由含药血浆样品不均匀性很小, 带来的不确定度非常小, 所以在本文中也忽略。

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(见图1), 评定显著性不确定度分量。

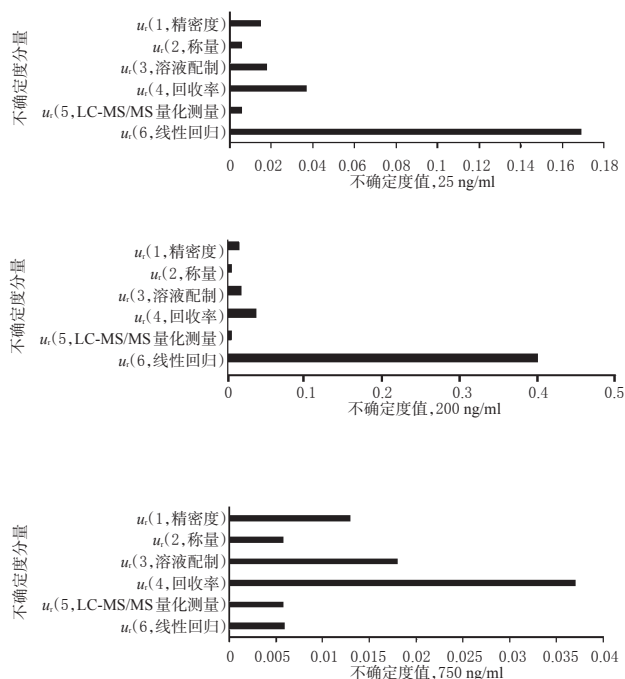


图1 不确定度分量的统计直方图

Fig 1 The statistical histograms of uncertainty components

结果提示不同浓度时, 高浓度时回收率对不确定度的贡献最大, 此外溶液的配制过程、重复测定的精密度和准确度也是不确定度的比较显著的影响因素。因此, 进行方法学研究时, 应将这些不确定度较大分量的步骤细化, 找出影响因素和解决办法, 例如加强技术人员的操作水平和技术培训、尽量使用同一规格的量器配制溶液、选择精密的量器和仪器、优化血浆前处理方法、尤其要注意标准曲线的线性拟合等, 以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] Mudigonda K, Jukanti R, Apte S S, et al. Rapid and simple liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of zidovudine in rat plasma [J]. *Biomed. Chromatogr*, 2008, 22(1): 20.
- [2] 孙摇华, 李相鸿, 周理想, 等. 液相色谱串联质谱法测定人血清中齐多夫定的浓度[J]. *安徽医药*, 2011, 5(15): 566.
- [3] 李明慧, 陈笑艳, 张逸凡, 等. 测定人血浆中齐多夫定的液相色谱-串联质谱法及生物等效性的应用[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25(2): 114.
- [4] 张丽军, 姚亚敏, 孙建军. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定奈韦拉平、拉米夫定、司他夫定、齐多夫定和依非韦伦的血药浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2010, 26(2): 133.

(收稿日期: 2014-05-13 修回日期: 2014-06-15)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅