

## HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的不确定度评定\*

严蓓<sup>1</sup> 杨晨<sup>1</sup> 李扬<sup>1</sup> 李可欣<sup>1\*\*</sup> 闫颖<sup>2</sup>

(1. 卫生部北京医院药理学部临床药理室, 北京 100730; 2. 卫生部北京医院卫生部临床检验中心, 北京 100730)

**摘要** 目的: 评定 HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的不确定度。方法: 对奥硝唑浓度测定过程中各影响因素, 包括测定精密性、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评定, 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: 人血浆中低( $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )、中( $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 浓度奥硝唑的扩展不确定度分别为  $0.088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.324 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $P=95\%$   $k=2$ )。结论: HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的不确定度主要由标准曲线拟合(尤其是低浓度)、标准溶液和血浆样品制备处理及仪器允差引入。

**关键词:** 药物分析; 奥硝唑; 生物样本; 血药浓度; 不确定度; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)09-1797-07

## Evaluation of uncertainty for the determination of ornidazole in human plasma by HPLC\*

YAN Bei<sup>1</sup>, YANG Chen<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, LI Ke-xin<sup>1\*\*</sup>, YAN Ying<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacology, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China;

2. National Center for Clinical Laboratories, Beijing Hospital, Ministry of Health, Beijing 100730, China)

**Abstract Objective:** To evaluate uncertainty for the determination of ornidazole in human plasma by HPLC.

**Methods:** It were analyzed that various factors affecting detection process, including repeatability, weighing, solution preparation, drug-spiked plasma preparation, solid phase extraction, HPLC error, calibration curve fitting, and so on. The expanded uncertainty was obtained by calculating each component of uncertainty and combined uncertainty.

**Results:** The expand uncertainty of  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  and  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  was  $0.088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$   $0.324 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively ( $P=95\%$   $k=2$ ).

**Conclusion:** When determination of ornidazole in human plasma by HPLC, the uncertainty was mainly caused by the standard curve fitting (especially the low level of ornidazole), solution and plasma preparation, sample pretreatment and HPLC error.

**Key words:** pharmaceutical analysis; ornidazole; biological sample; plasma drug concentration; uncertainty; HPLC

测量不确定度表征合理地赋予被测量之值的分散性, 广义讲是指对测量结果正确性的可疑程度<sup>[1]</sup>。在生物分析化学领域, 测量不确定度的评定越来越受到人们的重视, 它与实验室的质量控制(QC)和质量保证(QA)密切相关, 可作为方法学验证和水准鉴定的一部分<sup>[2]</sup>。奥硝唑是继甲硝唑、替硝唑之后的第3代新型硝基咪唑类抗菌药, 具有良好的抗厌氧菌和抗原虫感染作用。参考已发表文献<sup>[3,4]</sup>, 本文建立了 HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的方法。由于生物样本测定比较复杂, 步骤繁多, 结果变异的相关因素众多, 因而其不确定度评定较

为困难。本文以国家计量技术规范、不确定度评定的相关教材及文献为理论和方法指导<sup>[1,5-7]</sup>, 重点参考已发表文献<sup>[8,9]</sup>的评定步骤和内容, 以奥硝唑为例建立其生物样品中测定的不确定度评定方法, 控制血药浓度测定过程中关键步骤, 对主要影响因素进行分析评定, 最终得出检测结果扩展不确定度值。

### 1 仪器和试剂

高效液相色谱仪: Agilent 1100 HPLC; 色谱柱: Phenomenex<sup>®</sup>, Luna 5  $\mu\text{m}$ , C<sub>18</sub>, 250 mm  $\times$  4.60 mm; Mettler Toledo XP205 电子天平; 实验室用 50 mL 和

\* “十一五”国家科技重大专项“创新药物研究开发技术平台建设”; 编号: 2008ZX09312

\*\* 通讯作者 Tel: (010) 85133638; E-mail: kexinli6202@163.com

10 mL 量瓶, 5 mL 和 2 mL 单标线移液管, 5 mL 分度吸量管( 试验用玻璃量器均为 A 级); OASIS<sup>®</sup> HLB 固相萃取小柱( 30 mg, 1 cc, Waters, USA)。

奥硝唑对照品( 纯度: 99.4%; 批号: 200812A05; 湖南九典制药有限公司); 替硝唑( 内标; 纯度: 99.73%; 批号: 030105; 湖北科益制药股份有限公司); 甲醇( 色谱纯, Fisher Scientific, USA); 醋酸(  $\geq 99.5\%$  GC/T, Fluka); 超纯水由 Milli-Q 系统制得( Millipore, USA); 健康人空白血浆( 配制含药血浆用, 北京通州区血液中心提供)。

## 2 实验方法

**2.1 检测条件** 使用高效液相色谱-紫外( HPLC/UV) 检测: 流动相为乙腈-含 0.4% 醋酸的水( 35:65), 流速为  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 紫外检测波长为 312 nm, 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ , 进样体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 对照品工作液及内标工作液的配制

精密称量奥硝唑对照品 100 mg 于 50 mL 烧杯中, 加少量甲醇溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 然后用少量甲醇多次洗涤烧杯, 并将洗涤溶液全部转入量瓶中, 最后加甲醇稀释并定容至刻度, 得到浓度为  $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的储备液。用 2 mL 单标线移液管吸取储备液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的对照品溶液( L-1); 用 5 mL 单标线移液管吸取  $400 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-2); 用 5 mL 单标线移液管吸取  $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-3); 用 5 mL 单标线移液管吸取  $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-4); 用 2 mL 单标线移液管吸取  $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 2 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-5); 用 5 mL 单标线移液管吸取  $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-6); 用 5 mL 单标线移液管吸取  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  溶液 5 mL 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得  $2.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的工作液( L-7); L-1 至 L-7 为奥硝唑系列工作液。

精密称量替硝唑对照品 25 mg 于 50 mL 烧杯中, 以少量甲醇溶解后转移至 50 mL 量瓶中, 然后用少量甲醇多次洗涤烧杯, 并将洗涤溶液全部转入量

瓶中, 最后加甲醇稀释并定容至刻度, 得到浓度为  $500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标储备液。用 5 mL 分度吸量管吸取精密吸取 1 mL 内标储备液至于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释并定容至刻度, 得到浓度为  $50 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的内标工作液。

### 2.3 含药标准血浆的配制

用移液器( 量程范围是 20 ~ 200  $\mu\text{L}$ ) 吸取 50  $\mu\text{L}$  分别吸取系列浓度的奥硝唑工作液( L-1 至 L-7) 于 Eppendorf 管中, 然后用移液器( 量程范围是 100 ~ 1000  $\mu\text{L}$ ) 分别加入人空白血浆 500  $\mu\text{L}$ , 涡旋 30 s 混匀, 配制成浓度分别为 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的一系列标准血浆, 用移液器( 量程范围是 20 ~ 200  $\mu\text{L}$ ) 分别加入 20  $\mu\text{L}$  内标工作液。

按上述方法配制  $0.5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的含药标准血浆, 分别作为低( Low, L) 和中( Medium, M) 浓度质控样品, 进行方法的精密度和回收率考察。

**2.4 血浆样品预处理** 采用固相萃取法对血浆样品进行处理。采用 Waters OASIS<sup>®</sup> HLB 固相萃取小柱。①使用前活化: 用移液器加 1 mL 甲醇润湿小柱, 活化填料, 以使固相表面易于和被分析物发生分子间相互作用, 同时可以除去填料中可能存在的杂质; ②水洗: 用 1 mL 超纯水淋洗小柱, 预处理除去甲醇以便样本与固相表面发生作用, 也可避免样品中的蛋白质在有机溶剂中变性或沉淀出来, 堵塞柱子; ③加样: 用移液器吸取全部含药和内标的血浆上样, 然后用 1 mL 超纯水淋洗小柱去除样本中的内源性杂质和其他相关杂质, 弃去废液。④收集洗脱液: 用移液器吸取 0.5 mL 的 90% 甲醇水溶液( 含 1% 乙酸) 洗脱被分析物, 收集洗脱液进样检测。

### 2.5 样品检测与计算

按“2.1”项下条件以 HPLC/UV 进行样品的测定, 以奥硝唑信号的峰面积与内标替硝唑响应的峰面积之比对样品浓度做标准曲线。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  $R$  为奥硝唑信号峰面积与内标替硝唑信号峰面积之比,  $B_1$  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、吸量管、量瓶允差允差)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 $\mu_r(1)$

由重复观测(精密度)引入的不确定度属于 A 类不确定度。按“2.3”项下方法分别配制 0.5, 1, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的标准血浆, 并平行配制低(Low, L)和中(Medium, M)浓度质控样品各 5 份( $n=5$ )。按“2.4”项下方法处理后进样, 进行 HPLC/UV 测定, 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方程, 计算得到质控样品的浓度。一共重复进行 3 组( $n=5$ )这样的配制和测定, 结果见表 1。

表 1 奥硝唑重复测定浓度数据

Tab 1 The repeatability for measurement of ornidazole

标准曲线 (standard curve)	组别 (group)	浓度 (concentration) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	组别 (group)	浓度 (concentration) $/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	
$R = 0.2580C + 0.001411$	L1	$x_{11}$	M1	$x_{11}$	5.048
		$x_{12}$		$x_{12}$	5.017
		$x_{13}$		$x_{13}$	5.035
		$x_{14}$		$x_{14}$	5.014
		$x_{15}$		$x_{15}$	5.058
		$\bar{x}_1$		$\bar{x}_1$	5.034
$R = 0.2578C + 0.001175$	L2	$x_{21}$	M2	$x_{21}$	5.057
		$x_{22}$		$x_{22}$	5.018
		$x_{23}$		$x_{23}$	5.063
		$x_{24}$		$x_{24}$	5.065
		$x_{25}$		$x_{25}$	5.018
		$\bar{x}_2$		$\bar{x}_2$	5.044
$R = 0.2568C - 0.000425$	L3	$x_{31}$	M3	$x_{31}$	5.115
		$x_{32}$		$x_{32}$	5.098
		$x_{33}$		$x_{33}$	5.165
		$x_{34}$		$x_{34}$	5.105
		$x_{35}$		$x_{35}$	5.109
		$\bar{x}_3$		$\bar{x}_3$	5.118

依据贝赛尔公式计算合并样本偏差:

$$S_p(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.0078 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$S_p(x, M) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.023 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

公式中  $m$  为测量组数,  $n$  为每组的测量次数(本实验  $m=3, n=5$ );  $k$  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<sup>[5]</sup>:

$$S_p(\bar{x}, L) = \frac{S_p(x, L)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.0078}{\sqrt{3 \times 5}} = 0.0020$$

$$S_p(\bar{x}, M) = \frac{S_p(x, M)}{\sqrt{mn}} = \frac{0.023}{\sqrt{3 \times 5}} = 0.0060$$

则测量结果的相对标准不确定度为:

$$u_r(1, L) = u_r(x, L) = \frac{S_p(\bar{x}, L)}{x_{Total, L}} = \frac{0.0020}{5.501} = 0.0040$$

$$u_r(1, M) = u_r(x, M) = \frac{S_p(\bar{x}, M)}{x_{Total, M}} = \frac{0.0060}{5.066} = 0.0012$$

### 3.2.2 B类不确定度评定

#### 3.2.2.1 对照品称量引入的不确定度 $\mu_r(2)$

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:

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

不考虑重复性误差时,称量奥硝唑的相对标准不确定度为  $u_r(m_1) = \frac{u_c(m)}{\bar{m}_1} = \frac{0.041}{100} = 0.00041$ ,

称量内标的相对标准不确定度为  $u_r(m_2) = \frac{u_c(m)}{\bar{m}_2} \\ = \frac{0.041}{25} = 0.0016$ 。

称量引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(2) = \sqrt{u_r^2(m_1) + u_r^2(m_2)} \\ = \sqrt{0.00041^2 + 0.0016^2} \\ = 0.0017$$

#### 3.2.2.2 配制对照品溶液时引入的不确定度, $u_r(3)$

配制储备液所用容量瓶为 50 mL 量瓶,其最大允许误差为  $\pm 0.050 \text{ mL}$ ,配制标准溶液所用容量瓶均为 10 mL 量瓶,其最大允许误差为  $\pm 0.020 \text{ mL}$ 。按均匀分布,量瓶(Volumetric flask, VF)的相对标准不确定度为:

$$u_r(x, \text{VF}_1) = \frac{a_1}{k \bar{x}_1} = \frac{0.050}{\sqrt{3} \times 50} = 0.00058$$

$$u_r(x, \text{VF}_2) = \frac{a_2}{k \bar{x}_2} = \frac{0.020}{\sqrt{3} \times 10} = 0.0012$$

配制标准溶液时用到 2 mL 移液管、5 mL 移液管和 5 mL 分度吸量管,2 mL 移液管的最大允许误差为  $\pm 0.010 \text{ mL}$ ,5 mL 移液管的最大允许误差为  $\pm 0.015 \text{ mL}$ ,5 mL 分度吸量管的最大允许误差为  $\pm 0.025 \text{ mL}$ 。按均匀分布,移液管/分度吸量管(Pipet, P)的相对标准不确定度为:

$$u_r(x, P1) = \frac{a_1}{k \bar{x}_1} = \frac{0.010}{\sqrt{3} \times 2} = 0.0029$$

$$u_r(x, P2) = \frac{a_2}{k \bar{x}_2} = \frac{0.015}{\sqrt{3} \times 5} = 0.0017$$

$$u_r(x, P3) = \frac{a_3}{k \bar{x}_3} = \frac{0.025}{\sqrt{3} \times 5} = 0.0029$$

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:

$$u_r(3) = \sqrt{2u_r^2(x, \text{VF1}) + 8u_r^2(x, \text{VF2}) + 3u_r^2(x, P1) + 5u_r^2(x, P2) + u_r^2(x, P3)} \\ = \sqrt{2 \times 0.00058^2 + 8 \times 0.0012^2 + 3 \times 0.0029^2 + 5 \times 0.0017^2 + 0.0029^2} \\ = 0.0158$$

#### 3.2.2.3 配制含药标准血浆时引入的不确定度, $u_r(4)$

含药标准血浆是由 50  $\mu\text{L}$  奥硝唑工作液、500  $\mu\text{L}$  空白血浆和 20  $\mu\text{L}$  内标工作液混合而成,其不确定度主要由移液器引起。

移液器均为 Proline<sup>®</sup> 手动半支消毒移液器(Biohit, Finland),按厂商提供的技术参数,量取 50  $\mu\text{L}$  的最大允许误差为  $\pm 1.00\%$ ,量取 500  $\mu\text{L}$  的最大允许误差为  $\pm 0.70\%$ ,量取 20  $\mu\text{L}$  的最大允许误差为  $\pm 2.50\%$ 。由于温度对移液器的影响非常小,忽略不计。按均匀分布,移液器的相对标准不确定度为:

$$u_r(x_1) = \frac{a_1}{k \bar{x}_1} = \frac{0.01 \times 50}{\sqrt{3} \times 50} = 0.0058$$

$$u_r(x_2) = \frac{a_2}{k \bar{x}_2} = \frac{0.007 \times 500}{\sqrt{3} \times 500} = 0.0040$$

$$u_r(x_3) = \frac{a_3}{k \bar{x}_3} = \frac{0.025 \times 20}{\sqrt{3} \times 20} = 0.014$$

配制血浆溶液时的相对标准不确定度为:

$$u_r(4) = \sqrt{u_r^2(x_1) + u_r^2(x_2) + u_r^2(x_3)} \\ = \sqrt{0.0058^2 + 0.0040^2 + 0.014^2} \\ = 0.016$$

#### 3.2.2.4 血浆样品提取过程 $\mu_r(5)$

按“2.3”项下方法平行配制低(Low, L)和中(Medium, M)浓度质控样品各 5 份,按“2.4”项下方法处理后进样,进行 HPLC/UV 测定,得到峰面积设为 B;按照相同方法配制相同低(Low, L)和中(Medium, M)浓度的甲醇溶液各 5 份,直接进行 HPLC/UV 测定,得到峰面积设为 A。则奥硝唑在血浆中的回收率 =  $B/A \times 100\%$  结果见表 2。

表2 回收率(n=5)  
Tab 2 Results of recovery

浓度( concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	提取样品峰面积 ( B peak area of the extracted samples)	标准溶液峰面积 ( A peak area of the standard solution)	回收率( recovery) / %
0.5	29.7	31.7	93.69
	31.1	32.9	94.53
	30.6	32.2	95.03
	31.9	31.2	102.24
	31.8	31.1	102.25
平均回收率( average recovery) / %			97.55
回收率的 SD			0.0432
5	308.6	320.6	96.26
	302.3	316.7	95.45
	324.6	318.1	102.04
	317.8	314.6	101.02
	307.9	319.0	96.52
平均回收率( average recovery) / %			98.26
回收率的 SD			0.0303

回收率的相对标准不确定度:

$$u_r(5, L) = u_r(R, L) = \frac{SD, L}{R, L \sqrt{n}} = \frac{0.0432}{0.9755 \times \sqrt{5}} = 0.020$$

$$u_r(5, M) = u_r(R, M) = \frac{SD, M}{R, M \sqrt{n}} = \frac{0.0303}{0.9826 \times \sqrt{5}} = 0.014$$

3.2.2.5 HPLC 量化测量不确定度  $\mu_r(6)$

峰面积测定所用仪器型号为 Agilent 1100, 其定量的最大允差为 3% 按均匀分布, 其相对不确定度为:

$$u_r(6) = \frac{3}{100 \times \sqrt{3}} = 0.017$$

3.2.2.6 线性回归过程引入的不确定度  $\mu_r(7)$

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。配制浓度依次为 0.25 0.5 1 5 10 20 40  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准血浆样品, 提取后检测, 每个浓度测量 3 次, 共测得 21 对值, 即奥硝唑峰面积  $A_s$  和内标峰面积  $A_i$ , 以  $R = A_s / A_i$  计算不同浓度的 R 值(见表 3) [6]。

表3 奥硝唑与内标峰面积比值(n=3)

Tab 3 Peak area ratio of ornidazole to the internal standard

浓度 ( concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$R = A_s / A_i$			平均值 ( mean)
	1	2	3	
0.25	0.066	0.068	0.064	0.066
0.5	0.129	0.127	0.127	0.128
1	0.257	0.257	0.258	0.257
5	1.307	1.296	1.295	1.299
10	2.593	2.557	2.523	2.557
20	5.166	5.138	5.072	5.125
40	10.297	10.351	10.370	10.339

注( note): 7 个标准血浆排序为  $i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (m=7)$ ; 每个标准血浆测量 3 次的排序为  $j=1, 2, 3 (n=3)$  [The order of 7 standard plasma was  $i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 (m=7)$ ; the order of measurement of standard plasma for 3 times was  $j=1, 2, 3 (n=3)$  ]

用每个标准血浆 R 的平均值对浓度进行线性回归, 得回归方程, 其斜率  $a = 0.258165$ , 截距  $b = -0.00598$ 。

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (ax_i + b)]^2}{N - 2}} = 0.028$$

自相关方差为  $S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 3854.41$

本实验测定了低浓度和中浓度质控样品各 15 次, 得到平均浓度分别为  $\bar{x}_L = 0.501 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $\bar{x}_M = 5.066 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 其标准不确定度分别为:

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

$$= \frac{0.028}{0.258165} \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{21} + \frac{(0.501 - 10.964)^2}{3854.41}}$$

$$= 0.041$$

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

$$= \frac{0.028}{0.258165} \times \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{21} + \frac{(5.066 - 10.964)^2}{3854.41}}$$

$$= 0.038$$

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 ( $N = m \times n = 7 \times 3 = 21$ );  $J$  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 ( $i = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ );  $\bar{x}$  为  $m = 7$  个标准血浆浓度的平均值;  $x_i$  为第  $i$  个标准血浆的浓度。

则其相对标准不确定度为:

$$u_r(7L) = u_r(x_L) = \frac{u(x_L)}{x_L} = \frac{0.041}{0.501} = 0.082$$

$$u_r(7M) = u_r(x_M) = \frac{u(x_M)}{x_M} = \frac{0.038}{5.066} = 0.0075$$

### 3.3 合成不确定度的评定

奥硝唑浓度测定的相对标准不确定度为:

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

$$= \sqrt{0.0040^2 + 0.0017^2 + 0.0158^2 + 0.016^2 + 0.020^2 + 0.017^2 + 0.082^2}$$

$$= 0.089$$

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

$$= \sqrt{0.0012^2 + 0.0017^2 + 0.0158^2 + 0.016^2 + 0.014^2 + 0.017^2 + 0.0075^2}$$

$$= 0.032$$

奥硝唑浓度测定的标准不确定度为:

$$u_{c,L} = u_{c,r,L} \times \bar{x}_L = 0.089 \times 0.501 = 0.044 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u_{c,M} = u_{c,r,M} \times \bar{x}_M = 0.032 \times 5.066 = 0.162 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

### 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%, 奥硝唑浓度测定的扩展不确定度为:

$$U_L = k \times u_{c,L} = 2 \times 0.044 = 0.088 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$U_M = k \times u_{c,M} = 2 \times 0.162 = 0.324 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

人血浆中低浓度和中浓度质控样品中奥硝唑的浓度可分别表示为  $(0.501 \pm 0.088) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $(5.066 \pm 0.324) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $k = 2$  (95.45% 的置信区间))。

## 4 讨论

有关测定生物样本中药物浓度不确定度评定的文献相当有限, 且很多介绍的较为简略<sup>[9-12]</sup>, 并未如方法学验证那样具有公认和指导性的方法, 这可能是与生物样品中药物浓度的检测步骤复杂、干扰因素较多有关。本文探讨了人血浆中奥硝唑浓度测定的不确定度评定方法。

按照实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。本文中重点考虑上述过程中的测量重复性(精密性)、称量对照品、配制标准溶液、配制标准血浆、固相萃取过程、回收率、仪器量化、线性回归等因素。因为奥硝唑和内标的纯度均未被给出限度标识, 所以没有进行对照品纯度的不确定度计算; 实验环境在空调条件下温度控制恒定, 且奥硝唑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 30 s, 所以对照品工作液和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。图中显示标准曲线的线性回归对低浓度质控样品不确定度的贡献最大, 其次是回收率、仪器允差、血浆样品和对照品溶液的配制, 而仪器允差、血浆样品和对照品溶液配制、回收率是中浓度质控样品不确定度的最大分量。结果提示在实际操作中, 可以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, 为方法学建立提供科学指导, 使测定结果更加准确可靠, 例如加强技术人员的技术水平和技术培训、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、低浓度样品的测定尤其要注意标准曲线的线性拟合等等。

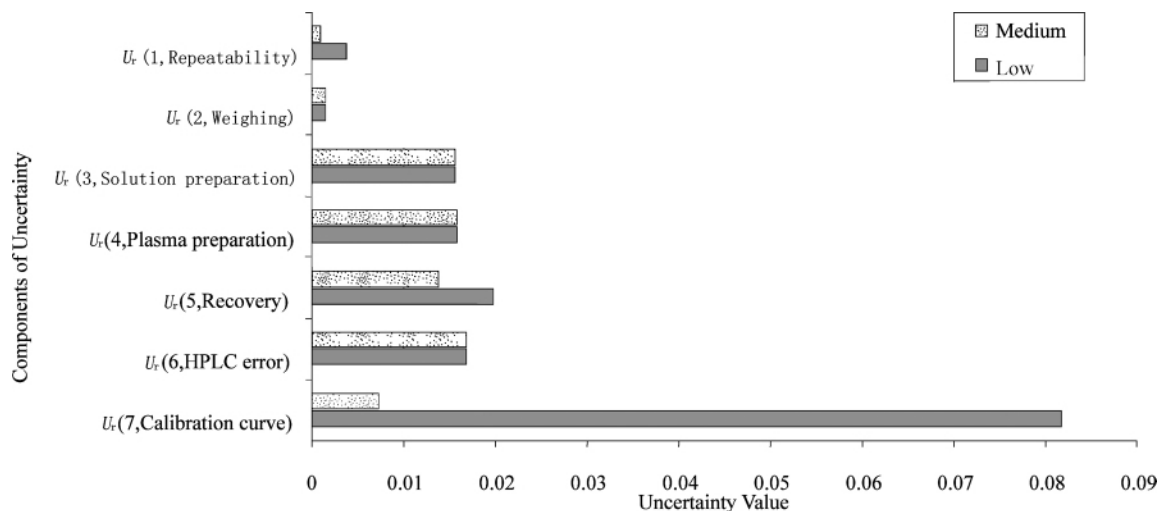


图1 不确定度分量的统计直方图

Fig 1 Statistic histogram of components of uncertainty

参考文献

- 1 Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement JJF1059-1999( 测量不确定度评定与表示) . 1999. 4
- 2 Burns M. Current practice in the assessment and control of measurement uncertainty in bio-analytical chemistry. *Trac Trend Anal Chem* 2004 23( 5) : 393
- 3 CAI Zhen( 蔡震) . Determination of ormidazole in plasma by HPLC ( 奥硝唑血药浓度的高效液相色谱法测定) . *Mod Med Health( 现代医药卫生)* 2008 24( 5) : 655
- 4 RU Ling( 汝玲) ,CHEN Hui( 陈汇) ,PANG Xue-bing( 庞雪冰) , *et al.* Quantitation and pharmacokinetics of ormidazole in human plasma( 高效液相色谱法测定奥硝唑的血药浓度及其人体药动学研究) . *Chin J New Drugs( 中国新药杂志)* 2004 13( 11) : 1027
- 5 SHI Chang-yan( 施昌彦) . Guidelines for Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement( 测量不确定度评定与表示指南) . Beijing( 北京) : China Mensuration Press ( 中国计量出版社) 2005. 32
- 6 NI Yu-cai( 倪育才) . Practical Evaluation of Uncertainty in Measurement( 实用测量不确定度评定) . Beijing( 北京) : China Mensuration Press( 中国计量出版社) 2004. 180
- 7 SU Xiao-li( 粟晓黎) ,LI Guan-min( 李冠民) ,JIN Shao-hong( 金少鸿) . Studies on evaluation of uncertainty for general analysis methods for quality control of drugs( 药品检验一般检测项目不确定度评定研究-1. B类评定) . *Chin J Pharm Anal( 药物分析杂志)* 2005 25( 6) : 699
- 8 ZHANG Xian-hua( 张现化) ,YANG Yi-heng( 杨毅恒) ,YANG Li( 杨丽) *et al.* Uncertainty evaluation on determination of risperidone in human plasma by HPLC-MS/MS( 液质联用法测定人血浆中利培酮浓度的不确定度评定) . *Chin J Pharm Anal( 药物分析杂志)* 2010 30( 3) : 366
- 9 ZHANG Qing-hua( 张清华) ,YANG Jin( 杨劲) ,HE Ying( 贺英) *et al.* Evaluation of measurement uncertainty for the determination concentration of troxerutin in human plasma by LC-MS/MS ( 对液相色谱-串联质谱测定曲克芦丁血药浓度的不确定度评价) . *Chin J Clin Pharmacol( 中国临床药理学杂志)* 2010 26( 1) : 68
- 10 Semeraro A ,Altieri I ,Patriarca M *et al.* Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: an application to the simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum by HPLC. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* , 2009 877( 11-12) : 1209
- 11 Zhang X ,Duan J ,Zhai S *et al.* Performance of tiloroxim and tilorone determination in human blood by HPLC-MS/MS: method validation uncertainty assessment and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010 , 878( 3-4) : 492
- 12 Cavalier E ,Rozet E ,Dubois N *et al.* Performance of iohexol determination in serum and urine by HPLC: validation ,risk and uncertainty assessment. *Clin Chim Acta* 2008 396( 1-2) : 80

( 本文于2010年10月9日收到)