

5 讨论

本次评价性抽验采取法定检验结合探索性研究的模式对注射用美洛西林钠从标准到质量现状、质量影响因素各方面进行了较全面的分析和评价。由法定检验可知,目前绝大部分国产注射用美洛西林钠均符合现行质量标准要求,合格率为99.5%,个别企业由于内部管理疏漏造成1批次样品的细菌内毒素不符合规定;现行质量标准基本可控制产品质量,但有关物质检查方法存在缺陷,造成杂质漏检且无法真正控制产品杂质变化,需进一步修订;综合探索性研究结果,国产样品杂质谱较国外样品复杂,因此应结合工艺,对杂质谱进行重点研究。

水分及水活度研究及相关分析均显示,水分与水活度明显正相关,与含量明显负相关。说明水分含量与本品质量密切相关,目前限度参照国外样品(含一分子结晶水)制订,但国内样品均不含结晶水,因此限度应趋于严格。

不同生产工艺样品的质量存在差异。同一原

料来源,冷冻干燥工艺水分、有关物质(单个杂质、杂质总和、杂质个数)、溶液的颜色、聚合物等均低于无菌分装工艺,提示冷冻干燥工艺优于无菌分装工艺。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 608-610.
- [2] USP 37 [S]. 2014: 3828-3829.
- [3] SUN C Y, DING T M, CHEN N L, et al. Quality evaluation and discussion on the current quality standard of Vitamin C injection [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(7): 853-857.
- [4] ZHAO X, HU C Q, JIN S H. The analysis of volatile substances of butyl rubber closures [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(3): 315-318.
- [5] ZHAO X, HU C Q, JIN S H. An HPLC method for determination of butylated hydroxytoluene in ceftriaxone sodium for injection [J]. Chin J Antibiotic(中国抗生素杂志), 2007, 9(32): 543-545.
- [6] Drug packaging materials and the guiding principles of drug compatibility test(药品包装材料与药物相容性试验指导原则) [S]. 2006-10-23.

收稿日期: 2015-02-05

HPLC-MS/MS 测定人血浆中盐酸左旋多巴甲酯浓度的不确定度评价

谢少斐, 邹珊, 黄俊芝, 张含春, 李伟, 黄海燕(南京长澳医药科技有限公司, 南京 210038)

摘要: 目的 评价液-质联用法测定人血浆中左旋多巴甲酯浓度的不确定度。方法 选用 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 2.4 μm)色谱柱;流动相由甲醇-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, pH=5.0)梯度洗脱;流速: 0.4 mL·min⁻¹。质谱条件: 选用电喷雾(ESI)离子源, 在正离子电离模式下, 采用多反应监测(MRM)的质谱扫描方式, 测定左旋多巴甲酯和内标的检测离子分别为: m/z 212.4→152.3、 m/z 166.4→148.3。测定左旋多巴甲酯含量后, 建立数学模型, 分析过程中各分量引起的不确定度, 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, 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(0.4, 4, 32 ng·mL⁻¹)浓度左旋多巴甲酯的扩展不确定度分别为 0.10, 0.23, 1.62 ng·mL⁻¹。结论 该方法适用于 LC-MS/MS 测定人血浆中左旋多巴甲酯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: 左旋多巴甲酯; 不确定度; 液-质联用法; 血浆

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-0994-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.024

Uncertainty Evaluation for the Determination of Levodopa Methyl Ester Hydrochloride Concentration in Human Plasma by HPLC-MS/MS

XIE Shaofei, ZOU Shan, HUANG Junzhi, ZHANG Hanchun, LI Wei, HUANG Haiyan(Nanjing Chang'ao Pharmaceutical Science and Technology Co., Ltd., Nanjing 210038, China)

作者简介: 谢少斐, 男, 博士, 助理研究员 Tel: (025)86912180

E-mail: xieshaofei@changao.com

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the measurement uncertainty in determination of levodopa methyl ester hydrochloride in plasma by LC-MS/MS. **METHODS** Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ column(4.6 mm×100 mm, 2.4 μm) was used, the mobile phase consisted of methanol and ammonium acetate(10 mmol·L⁻¹, pH=5), using gradient elution, and the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Mass spectrometry was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode, with *m/z* 212.4→152.3 for levodopa methyl ester hydrochloride and *m/z* of 166.4→148.3 for internal standard. A mathematical model was established to analyze the source of uncertainty. 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(0.4, 4, 32 ng·mL⁻¹) concentration of zidovudine were 0.10, 0.23, 1.62 ng·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** This method is suitable for the uncertainty evaluation for the determination of levodopa methyl ester hydrochloride concentration in human plasma by LC-MS/MS, and provides reference for uncertainty evaluation of complex biological matrix analysis.

KEY WORDS: levodopa methyl ester hydrochloride; uncertainty; LC-MS/MS; plasma

新药的临床药代动力学研究, 是全面认识人体与药物间相互作用不可或缺的重要组成部分, 也是临床制定合理用药方案的依据。与此同时, 药代动力学及生物等效性研究需进行大量的生物样品检测工作, 样品检测结果是新药临床试验数据分析的基础, 也是选择正确的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至关重要^[1]。目前, 国内外普遍使用测量不确定度来评价测量结果, CNAS-CL01.2006《检测和校准实验室能力认可准则》“5.4.6.2”明确规定: “检测实验室应具有并应用评定测量不确定度的程序”^[2], CNAS-GL05.2011《测量不确定度要求的实施指南》以及 CNAS-GL06.2006《化学分析中不确定度的评估指南》也对不确定度的评价作出了详细说明^[3-4]。本实验通过参考相关文献^[5-8], 对 HPLC-MS/MS 测定人血浆中左旋多巴甲酯浓度的不确定度进行了评价, 探讨复杂生物基质中药物浓度测定的不确定度评定方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

HPLC-MS/MS 系统: Agilent 1290 超高效液相色谱仪, 配有 6460 型三重四级杆质谱仪, 美国 Agilent 公司; 色谱工作站: MassHunter B.05.00; 色谱柱: Thermo BDS HYPERSIL C₁₈(4.6 mm×100 mm, 2.4 μm); XS105DU、AL104 型电子天平(美国 METTLER TOLEDO 公司); 3-30K 台式高速离心机(德国 Sigma 公司); Vortex Genie-2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司); 移液器(德国 Eppendorf 公司): 2~20 μL、20~200 μL、100~1 000 μL。

1.2 试剂

盐酸左旋多巴甲酯对照品(南京长澳医药科技有限公司, 批号: ZXDB120501, 含量: 99.7%); 内标盐酸伪麻黄碱对照品(中国药品生物制品检定研究所, 批号: 171237-200505, 含量: 99.9%); 高氯酸(金鹿化工有限公司, 分析纯, 批号: 10015118); 甲醇(美国 Merck 公司, 色谱纯, 批号: 1990O06); 冰醋酸(分析纯, 批号: 20120206)、乙酸铵(分析纯, 批号: 20121030)均购自南京化学试剂一厂; 水为公司 Milli-Q 自制超纯水; 其余试剂均为市售分析纯。

2 方法

2.1 检测条件

色谱条件: 选用 Thermo BDS HYPERSIL C₁₈(4.6 mm×100 mm, 2.4 μm)色谱柱; Thermo BDS HYPERSIL C₁₈(4 mm×10 mm, 2.4 μm)预柱; 流动相由甲醇-水(含 10 mmol·L⁻¹ 乙酸铵, pH=5.0)梯度洗脱: 0~1.4 min, 有机相 10%, 1.5~9.8 min, 有机相 25%, 10.5 min, 有机相 10%; 流速: 0.4 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样体积: 20 μL; 每个样本的分析时间为 10.5 min。

质谱条件: 选用电喷雾(ESI)离子源, 在正离子电离模式下, 采用多反应监测(MRM)的质谱扫描方式, 测定左旋多巴甲酯和内标的检测离子分别为: *m/z* 212.4→152.3、*m/z* 166.4→148.3; 测定左旋多巴甲酯和内标的 Fragment(eV)分别为 135 和 86, CE(eV)分别为 10 和 5; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 5 L·min⁻¹; 辅助气压力: 45 psi; 鞘气温度: 400 °C; 鞘气流速: 10 L·min⁻¹; 毛细管温度: 3 000 V。

2.2 溶液配制

2.2.1 左旋多巴甲酯储备液及工作液的配制 精密称取盐酸左旋多巴甲酯对照品 10.00 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为左旋多巴甲酯储备液 I。用甲醇将储备液 I 稀释至 2, 4, 10, 20, 40, 100, 200, 400 ng·mL⁻¹。

2.2.2 内标储备液及工作液的配制 精密称取盐酸伪麻黄碱对照品 10.00 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为盐酸伪麻黄碱储备液 II, 用甲醇将储备液 II 稀释成 20 ng·mL⁻¹ 内标溶液。

2.2.3 标准曲线血浆样本以及质控样本的制备 精密量取左旋多巴甲酯工作液适量, 置 1.5 mL EP 管中, 挥干, 加入空白人血浆 500 μL, 涡旋混匀, 配制成左旋多巴甲酯浓度为 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20, 40 ng·mL⁻¹ 的标准曲线样本, 以及左旋多巴甲酯浓度为 0.4, 4, 32 ng·mL⁻¹ 的质控样本。

2.3 血浆样本的处理

精密量取血浆 500 μL 置 1.5 mL EP 管中, 加入内标伪麻黄碱 80 μL(20 ng·mL⁻¹), 涡旋混匀 30 s, 再加入 4%高氯酸 500 μL, 涡旋 3 min, 16 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液至进样瓶中, 按“2.1”项下方法进行进样测定。

2.4 样品检测与计算

采用 HPLC-MS/MS 进行样品的测定, 以左旋多巴甲酯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。

2.5 数学模型的建立

左旋多巴甲酯中药物浓度根据标准曲线回归方程通过待测物峰面积与内标的比值计算得出, 因此待测样品中药物浓度的数学模型为:

$$C_{\text{样品}} = (f - a) / b$$

其中 $C_{\text{样品}}$ 是药物浓度, f 是峰面积与内标的比值, a 是标曲截距, b 是标曲斜率。

3 结果

3.1 不确定度的来源

生物样本分析药物浓度测试主要步骤包括含药标准血浆配制、加入内标、样品前处理、仪器测定、标曲回归计算。操作中涉及的不确定度的来源主要由操作重复性、对照品纯度、天平称量、量瓶定容、标曲配制、移液器移液、样品前处理、仪器定量误差、标曲拟合、环境温度等因素引入, 见图 1。

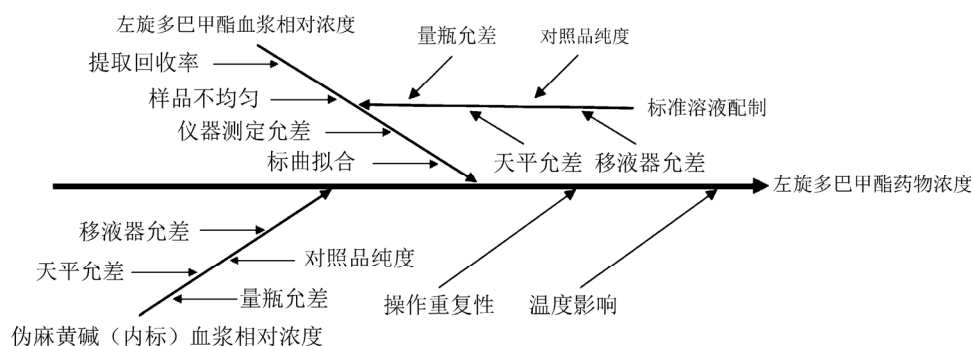


图 1 不确定性分量因果图

Fig. 1 Causality diagram of uncertainty source

3.2 各分量不确定度的评定

3.2.1 A 类不确定度评定为 $u_r(1)$ 由精密度引入的不确定度属于 A 类不确定度。低, 中, 高质控浓度分别为 0.4, 4, 32 ng·mL⁻¹, 每组平均 5 份样品($n=5$), 共重复进行 3 组($m=3$), 结果见表 1。

依据贝赛尔公式计算合并样本偏差:

$$S_p(x, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m \sum_{k=1}^n (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}{m(n-1)}} = 0.020 \ 2$$

测定结果的相对标准不确定度为:

$$\begin{aligned} x_{\text{total}}(L) &= 0.41 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \\ S_p(\bar{x}, L) &= \frac{S_p(x, L)}{\sqrt{mn}} = 0.005 \ 2 \\ u_r(1, L) &= \frac{S_p(\bar{x}, L)}{x_{\text{total}}(L)} = 0.012 \ 9 \end{aligned}$$

其中 m 为测量组数($m=3$); n 为每组的测量次数($n=5$); $x_{\text{total}}(L)$ 为 15($m \times n$) 个低浓度血浆浓度的平均值; k 为每组平行测定分数(1, 2, ..., n); j

为组数(1, 2, ..., m)。

表 1 左旋多巴甲酯重复测定浓度数据

Tab. 1 Repeated measurement concentrations of levodopa methyl ester hydrochloride

编号	浓度/ng·mL ⁻¹		
	0.4	4	32
1-1	0.41	4.12	31.41
1-2	0.38	4.03	32.27
1-3	0.39	4.03	30.06
1-4	0.40	4.18	29.26
1-5	0.37	4.22	29.79
2-1	0.36	3.96	35.01
2-2	0.37	3.50	34.95
2-3	0.42	4.11	31.61
2-4	0.40	3.86	31.26
2-5	0.42	3.94	32.30
3-1	0.45	4.32	34.37
3-2	0.43	4.22	32.34
3-3	0.43	4.38	33.20
3-4	0.43	4.01	29.98
3-5	0.42	4.20	29.79

按同样方法计算中、高浓度的相对标准不确定度为：

$$u_r(1, M)=0.010\ 3$$

$$u_r(1, H)=0.014\ 0$$

3.2.2 B 类不确定度评定

3.2.2.1 天平称量引入的不确定度为 $u_r(2)$ 使用美国 METTLER TOLEDO 公司 XS105DU 型电子天平称量标准品，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。根据所用天平送检报告， $e=0.1\text{ mg}$ 。天平的非线性误差和自动调零引起的误差分别为 $u(\Delta, \text{Nonlinear})$ 和 $u(\Delta, \text{Zeroing})$ 。

按均匀分布，包含因子 k 取 $\sqrt{3}$ ，随机变量半宽 $a=0.5e$ ，自动调零作为 1 次扣皮，所以 $a_0=a$ 。

天平的标准不确定度为：

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

$$u_c(m) = \sqrt{\left(\frac{a}{k}\right)^2 + \left(\frac{a_0}{k_0}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{0.5e}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.5e}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0.041\ 0$$

相对标准不确定度为($m1$ 和 $m2$ 分别为左旋多巴甲酯和内标的称量值)：

$$u_r(m2) = \frac{u_c(m)}{m2} = 0.004\ 1$$

$$u_r(m1) = \frac{u_c(m)}{m1} = 0.004\ 1$$

称量引起的相对标准不确定度为：

$$u_r(2) = \sqrt{u_r^2(m1) + u_r^2(m2)} = 0.005\ 8$$

3.2.2.2 标准溶液配置引入的不确定度为 $u_r(3)$

配制贮备液时使用规格为 10 mL 的量瓶，查阅《常用玻璃量器检定规程》JJG 196-2006，其容量允差为 $\pm 0.02\text{ mL}$ 。按三角分布计算，该量瓶(VF)的相对标准不确定度为：

$$u_r(x, VF_{10}) = \frac{a}{k \cdot x_1} = \frac{0.02}{\sqrt{3} \times 10} = 0.001\ 2$$

配置过程中使用的移液器分别为 P1(20~200 μL)、P2(100~1 000 μL)、P3(2~20 μL)移液器，P1 和 P2 的最大允许误差均为 0.6%，P3 的最大允许误差为 1%。按均匀分布，包含因子 k 取 $\sqrt{3}$ ， a 为最大允许误差。按三角分布，移液器的相对标准不确定度为：

$$u_r(x, p1) = \frac{a}{k \cdot x_1} = \frac{0.006 \times x_1}{\sqrt{3} \times x_1} = 0.003\ 5$$

$$u_r(x, p2) = \frac{a}{k \cdot x_2} = \frac{0.006 \times x_2}{\sqrt{3} \times x_2} = 0.003\ 5$$

$$u_r(x, p3) = \frac{a}{k \cdot x_3} = \frac{0.01 \times x_3}{\sqrt{3} \times x_3} = 0.005\ 8$$

不考虑重复性误差，考虑到逐级稀释的操作次数，配制溶液引入的对标准不确定度为：

$$u_r(3) = \sqrt{2u_r^2(x, VF_{10}) + u_r^2(x, p1) + 17u_r^2(x, p2)} = 0.014\ 8$$

3.2.2.3 含药血浆配置引入的不确定度为 $u_r(4)$

含药血浆配置引入的不确定度主要由配置过程中使用的移液器引起。在“3.2.2.2”中已计算 P1(20~200 μL)、P2(100~1 000 μL)、P3(2~20 μL)移液器不确定度分别为 0.003 5, 0.003 5, 0.005 8。代入计算得配制含药血浆时的相对标准不确定度为：

$$u_r(4) = \sqrt{u_r^2(x, p1) + 3u_r^2(x, p2) + u_r^2(x, p3)} = 0.009\ 1$$

3.2.2.4 血浆样品提取过程引入的不确定度为 $u_r(5)$

取 6 份不同来源的空白人血浆，按“2.2”项下方法配置 0.4, 4, 32 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取组样本($n=6$)，按“2.3”项下方法处理，进样得峰面积 A 。另取 6 份不同来源的空白人血浆，按“2.3”项下方法处理后，取上清液分别配置终浓度为 0.4, 4, 32 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的未提取样本($n=6$)，进样得峰面积 B 。计算左旋多巴甲酯在人血浆样本中的提取回收率(提取回收率= $A/B \times 100\%$)，结果见表 2。

表 2 提取回收率结果统计(n=6)

Tab. 2 Results of extraction recovery(n=6)

理论浓度/ ng·mL ⁻¹	提取回收率/%						Mean/%	Sd/%
	1	2	3	4	5	6		
0.4	91.23	105.77	97.22	96.88	105.50	107.48	100.68	6.50
4	103.60	96.46	105.34	103.97	104.57	101.81	102.62	3.24
32	102.52	101.54	104.26	107.35	102.16	105.90	103.95	2.30

回收率的相对标准不确定度为:

$$u_r(5, L) = u_r(R, L) = \frac{SD_L}{R_L \sqrt{n}} = \frac{6.50}{100.68 \times \sqrt{6}} = 0.0264$$
$$u_r(5, M) = u_r(R, M) = \frac{SD_M}{R_M \sqrt{n}} = \frac{3.24}{102.62 \times \sqrt{6}} = 0.0129$$
$$u_r(5, H) = u_r(R, H) = \frac{SD_H}{R_H \sqrt{n}} = \frac{2.30}{103.95 \times \sqrt{6}} = 0.0090$$

其中 n 为各浓度检测次数($n=6$), R_L 、 R_M 、 R_H 分别为低、中、高浓度回收率均值。

3.2.2.5 线性回归过程引入的不确定度为 $u_r(6)$

以加权最小二乘法进行线性回归, 得标准曲线方程。标准曲线各浓度点实测值及斜率和截距数据见表 3。

表 3 各拟合标准曲线的参数

Tab. 3 The parameters of fitted calibration curves

理论浓度/ ng·mL ⁻¹	1	2	3	4	5
0.2	0.0089	0.0190	0.0131	0.0105	0.0109
0.4	0.0168	0.0296	0.0219	0.0212	0.0231
1	0.0501	0.0598	0.0660	0.0608	0.0650
2	0.1019	0.1154	0.1111	0.1240	0.1312
4	0.2064	0.2213	0.2514	0.2684	0.2609
10	0.5383	0.5391	0.6083	0.6598	0.6537
20	1.0510	1.1086	1.1038	1.2789	1.2981
40	2.2436	2.2605	2.4319	2.5291	2.2627
斜率 a	1.0566	1.0784	1.1845	1.2881	1.2814
截距 b	-0.0023	0.0081	0.0008	-0.0029	-0.0019
相关系数 r	0.9968	0.9992	0.9929	0.9982	0.9964

残余标准偏差为:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (ax_j + b)]^2}{N - 2}} = 0.1749$$

自相关方差为:

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 6857.14$$

本试验测定了低、中、高浓度质控样本共 3 组, 每组 5 次共 15 次, 精密度均值分别为 $\bar{x}_L = 0.41 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x}_M = 4.07 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x}_H = 31.84 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 平均浓度分别为:

$$u_r(x, L) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x}_{\text{total}})^2}{S_{xx}}} = 0.0479$$
$$u_r(x, M) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x}_{\text{total}})^2}{S_{xx}}} = 0.0461$$
$$u_r(x, H) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x}_{\text{total}})^2}{S_{xx}}} = 0.0600$$

公式中 a 为标准曲线斜率; b 为标准曲线截距; P 为测定 x 的总次数($P=3 \times 5=15$); N 为测定标准血浆的总次数($N=8 \times 5=40$); J 为测定标准血浆的序数($J=1, 2, 3 \cdots N$); i 为标准血浆的序数($i=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$); $\bar{x}_{\text{total}}$ 为 $m=8$ 个标准血浆浓度的平均值; x_i 为第 i 个标准血浆的浓度。

其相对标准不确定度为:

$$u_r(6, L) = \frac{u_r(x, L)}{\bar{x}_L} = \frac{0.0479}{0.41} = 0.1182$$
$$u_r(6, M) = \frac{u_r(x, M)}{\bar{x}_M} = \frac{0.0461}{4.07} = 0.0113$$
$$u_r(6, H) = \frac{u_r(x, H)}{\bar{x}_H} = \frac{0.0600}{31.84} = 0.0019$$

3.2.2.6 仪器量化引入的不确定度为 $u_r(7)$ 所用仪器型号为 Agilent 1290 超高效液相色谱仪, 配有 6460 型三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司), 其定量的允差为 1%, 按均匀分布, 其相对标准不确定度为:

$$u_r(7) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} = 0.0058$$

3.3 合成不确定度的评定

左旋多巴甲酯低浓度的合成相对标准不确定度为:

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

$$u_{c,r,L} = \sqrt{0.0129^2 + 0.0058^2 + 0.0148^2 + 0.0091^2 + 0.0264^2 + 0.1182^2 + 0.0058^2} = 0.1233$$

相同方法计算得左旋多巴甲酯中、高浓度的合成相对标准不确定度为:

$$u_{c,r,M}=0.0277, u_{c,r,H}=0.0255$$

左旋多巴甲酯低、中、高浓度测定的标准不确定度为:

$$u_{c,L} = u_{c,r,L} \times \bar{x}_L = 0.1233 \times 0.41 = 0.0500$$

$$u_{c,M} = u_{c,r,M} \times \bar{x}_M = 0.0277 \times 4.07 = 0.1130$$

$$u_{c,H} = u_{c,r,H} \times \bar{x}_H = 0.0255 \times 31.84 = 0.8116$$

3.4 扩展不确定度的确定

包含因子取 $k=2$, 对应置信概率为 95%, 得到扩展不确定度:

$$U_L = k \times u_{c,L} = 2 \times 0.0500 = 0.10$$

$$U_M = k \times u_{c,M} = 2 \times 0.1130 = 0.23$$

$$U_H = k \times u_{c,H} = 2 \times 0.8116 = 1.62$$

3.5 测定结果的表示($k=2, P=95\%$)

人血浆中左旋多巴甲酯浓度的测定结果可分别表示为: 低浓度(0.41 ± 0.10)ng·mL⁻¹、中浓度

(4.07 ± 0.23)ng·mL⁻¹、高浓度(31.84 ± 1.62)ng·mL⁻¹。

4 讨论

本实验建立了 HPLC-MS/MS 测定人血浆中左旋多巴甲酯浓度的方法, 并进行部分方法学考察, 同时按照试验的顺序逐步寻找不确定度的来源, 结合左旋多巴甲酯浓度测试的特点, 不确定度的分量主要有测量重复性(精密度)、称量对照品、配制标准溶液、含药血浆的配置、提取回收率、仪器量化、线性回归等。此外, 本实验环境温度均在常规控制下(20 ± 5)℃, 排除环境温度对结果的影响。且精密度和回收率研究也表明了溶液均匀性和血浆样品均匀性对实验结果影响极小。所以溶液均匀性和血浆样品均匀性及温度的影响在本实验中被忽略不计。

根据计算出的不确定度分量值见表 4, 绘制出各不确定度分量的统计直方图见图 2, 评定显著性不确定度分量。

表 4 不确定度分量值统计

Tab. 4 The statistic of uncertainty components

不确定度分量	$u_r(1)$ 精密度	$u_r(2)$ 天平称量	$u_r(3)$ 标准溶液配置	$u_r(4)$ 含药血浆配置	$u_r(5)$ 血浆样品提取	$u_r(6)$ 线性回归	$u_r(7)$ 仪器量化
低浓度(L)	0.0129				0.0264	0.1182	
中浓度(M)	0.0103	0.0058	0.0148	0.0091	0.0129	0.0113	0.0058
高浓度(H)	0.0140				0.0090	0.0019	

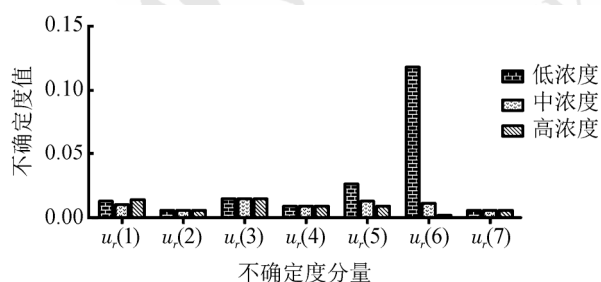


图 2 不确定度分量的统计直方图

Fig. 2 The statistical histograms of uncertainty components

结果显示: 精密度、标准溶液的配制、血浆样品提取、线性回归过程引入的不确定度影响较大, 根据 CNAS-GL06: 2006 第 7.7 节, 不同的不确定度的分量的量化可以利用实验室内方法开发和确认研究中的数据, 结合该项目测试特点, 不确定度的分量可简化为精密度、标准溶液

的配置、血浆样品提取、线性回归。简化后计算各浓度扩展不确定度($k=2, P=95\%$)分别为 $U_L=0.10$ 、 $U_M=0.20$ 、 $U_H=1.42$ 。人血浆中左旋多巴甲酯浓度的测定结果可分别表示为: 低浓度(0.41 ± 0.10)ng·mL⁻¹、中浓度(4.07 ± 0.20)ng·mL⁻¹、高浓度(31.84 ± 1.42)ng·mL⁻¹。简化后的不确定度评定方法兼顾了分量较大的不确定度因素, 同时也简化了整个评价过程, 更贴合实际, 有利于实验室更好开展项目。为了减小不确定度对实验结果的影响, 在进行方法学研究时, 应对该不确定度进行步骤细化, 寻找影响因素和解决办法。具体措施如: 尽量选择蛋白沉淀法作为血浆前处理方法; 开展人员比对, 加强培训, 提高技术人员的操作水平; 实验前选择更加精密的量器和仪器; 控制实验室温湿度; 实验前对仪器进行核查和维护等,

都可以减少对不确定度各分量的影响,为方法学建立提供科学指导。最终有效的提高检测结果的准确性和可靠性。

REFERENCES

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS CL10. 检测和校准实验室能力认可准则在化学领域的应用说明[S]. 2012.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS CL01. 检测和校准实验室能力认可准则[S]. 2006.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL05. 测量不确定度要求的实施指南[S]. 2011.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS GL06. 化学分析中不确定度的评估指南[S]. 2006.
- [5] YU Y Y, ZHANG Q Y, HUANG M, et al. Uncertainty

evaluation of rebamipide concentration in human plasma by HPLC-MS/MS [J]. China Med Pharm(中国医药科学), 2013, 3(22): 42-45.

- [6] ZHAO N P, WANG Z, ZHANG L, et al. Uncertainty evaluation in concentration determination of Rabepazole in plasma by LC/MS/MS [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2014, 23(2): 210-214.
- [7] YAN B, CAO G Y, LI K X, et al. Uncertainty evaluation for the determination of pinocembrin in human plasma and urine by LC-MS/MS and comparative analysis [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2014, 34(7): 1216-1222.
- [8] CHEN J Q. Evaluation of measurement uncertainty for determination of five organochlorine pesticide residues in Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2014, 31(1): 95-99.

收稿日期: 2015-02-26

UPLC-Q-TOF-MS 测定保健食品中非法添加的未知西地那非类物质

裘一婧, 邹耀华(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310015)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱法测定保健食品中非法添加的西地那非类成分。方法 采用 ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱, 采用 TOF-MS/MS 扫描模式检测。结果 样品中检测出西地那非类未知化合物, 经 MSC 与 Chemspider 分析, 分式为 C₂₄H₃₄N₆O₄S₂。结论 该方法可以用于快速检测保健食品中非法添加的未知西地那非类物质。

关键词: 超高效液相色谱四级杆飞行时间串联质谱; 保健食品; 非法添加; 西地那非类物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)08-1000-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.08.025

Determination of Illegal Added Unknown Sildenafil Substances in Health Care Products by UPLC-Q-TOF-MS

QIU Yijin, ZOU Yaohua(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a UPLC/Q-TOF-MS method for the detection of illegal added unknown sildenafil substances in health care products. **METHODS** ZORBAX SB C₁₈ chromatographic column(4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used. Mobile phase was acetonitrile(A)-0.1% formic acid solution(B) with the gradient elution. TOF and target MS/MS scanning mode was adopted. **RESULTS** The unknown sildenafil compound was found in samples. The fraction which analyzed by MSC and Chemspider was C₂₄H₃₄N₆O₄S₂. **CONCLUSION** This method can be used for rapid detection of unknown sildenafil substance which is illegally added in health care products.

KEY WORDS: UPLC-Q-TOF-MS; health care products; illegal added; sildenafil substances

近年来补肾壮阳类的保健食品一直占据着较大的市场,但有些保健品的生产极不规范,随意违规添加一些化学药物成分,主要以西地那非和他达

拉非为主^[1-3]。早在 2009 年国家食品药品监督管理局就发布了关于补肾壮阳类中成药非法添加 11 种 PDE₅ 型抑制剂(那红地那非、红地那非、伐他那非、

作者简介: 裘一婧, 女, 主管药师 Tel: 13634180011 E-mail: honeyqyj@163.com