

HPLC 测定人血浆中吡非尼酮浓度的不确定度评定

陈敏纯, 吴利娜, 闫抗抗, 薛飞, 王焱, 刘生元, 谷建俐, 曹青* (西北大学附属医院, 西安市第三医院, 西安 710018)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定人血浆中吡非尼酮浓度的不确定度分析方法。方法 分析 HPLC 测定吡非尼酮浓度的全过程, 分析测量不确定度的来源和大小, 量化各个测量不确定度分量, 合成标准测量不确定度并报告扩展测量不确定度。结果 人血浆中低浓度($0.511\ 0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中浓度($2.038\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高浓度($19.95\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的扩展不确定度分别为 0.105 1, 0.137 6, 1.069 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($P=95\%$)。结论 本方法不确定度来自标准曲线的拟合, 其适用于 HPLC 测定人血浆吡非尼酮的不确定度评定。

关键词: 高效液相色谱法; 吡非尼酮; 不确定度

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)08-0953-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.011

引用本文: 陈敏纯, 吴利娜, 闫抗抗, 等. HPLC 测定人血浆中吡非尼酮浓度的不确定度评定[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 953-957.

Uncertainty Evaluation on Determination of Pirfenidone in Human Plasma by HPLC

CHEN Minchun, WU Lina, YAN Kangkang, XUE Fei, WANG Yan, LIU Shengyuan, GU Jianli, CAO Qing* (Xi'an No.3 Hospital, the Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an 710018, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the measurement uncertainty in determination of pirfenidone in plasma by HPLC. **METHODS** The various factors influencing the uncertainty in the whole process of determination, were all analyzed and estimated. The uncertainty of each variable was calculated. The expanded uncertainties and combined uncertainty were analyzed with all the components. **RESULTS** The expanded uncertainty for low($0.511\ 0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), medium($2.038\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and high($19.95\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) level of pirfenidone were 0.105 1, 0.137 6, 1.069 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively ($P=95\%$). **CONCLUSION** The uncertainty of the method is mainly caused by the calibration curve. The method is applicable for the uncertainty evaluation of pirfenidone determination in human plasma by HPLC.

KEYWORDS: HPLC; pirfenidone; uncertainty

测量不确定度是表示被测量值的分散性, 通过分析所建立的方法学中测量不确定度各个分量的来源和大小, 对检测结果的准确性、可信性和可接受性进行客观的评价。CNAS-CL01 2018《检测和校准实验室能力认可准则》就明确规定了检测实验室必须具有制定评定测量不确定度的能力并制定相关的程序。吡非尼酮是广谱抗纤维化作用的新型化合物, 其能够预防、逆转纤维化和瘢痕组织的形成, 主要为治疗特发性肺纤维化, 减少肺部炎症, 抑制过量的胶原沉积^[1]。本研究根据相关的指南和规范^[2-4]及相关文献^[5-9], 对 HPLC 测定人血浆中吡非尼酮浓度的不确定度进行评定研究。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Agilent 1200LC 液相色谱仪(G1312A 二元

泵, 自动进样器, G1314B VWD 检测器, 数据采集处理系统); Anke TGL-16G 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); Sartorius BP211D 电子天平(瑞士 Sartorius 公司); XW-80A 旋涡混合仪(海门市其林贝尔仪器有限公司); Milli-Q plus 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

吡非尼酮对照品(西安天一秦昆制药有限公司, 批号: 090411; 纯度: 99.6%); 内标(IS): 水杨酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100106-200303; 纯度: 100%); 高氯酸、磷酸为分析纯, 均购自南天津市百世化工有限公司; 甲醇为色谱纯(Fisher Scientific 公司); 水为自制超纯水; 空白血浆采集自健康受试者。

1.2 色谱条件

Inspire C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm);

作者简介: 陈敏纯, 女, 硕士, 主管药师
15353497890 E-mail: carlosq@163.com

Tel: 13991328425

E-mail: minchun.chen@163.com

*通信作者: 曹青, 女, 硕士, 主管药师

Tel:

柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 310 nm; 流动相: 甲醇-0.2%磷酸水溶液(59:41); 流速: 1 mL·min⁻¹。

1.3 对照品溶液配制

吡非尼酮对照品溶液的配制: 精密称取吡非尼酮对照品 10.04 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 配成 1.0 mg·mL⁻¹ 吡非尼酮储备液。依次将其用甲醇稀释成浓度分别为 400, 100, 40, 4 μg·mL⁻¹ 的吡非尼酮对照品溶液。

IS(水杨酸)对照品溶液的配制: 精密称取水杨酸 20.10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解, 定容, 即得内标储备液, 浓度为 0.2 mg·mL⁻¹。

1.4 血浆样品的处理

取含药血浆 0.4 mL, 置于 1.5 mL 的 EP 离心管中, 精密加入 27 μL 的内标溶液(0.2 g·mL⁻¹), 旋涡混匀 30 s 后; 再精密加入 200 μL 的 10%高氯酸溶液, 旋涡混匀 3 min, 于转速为 16 000 r·min⁻¹ 的高速离心机上离心 10 min。分别吸取上清液 20 μL 按“1.2”项下色谱条件进行分析。

1.5 标准曲线制备

取空白血浆 0.4 mL, 置于 1.5 mL 的 EP 离心管中, 精密吸取吡非尼酮对照品溶液, 旋涡混匀 30 s, 制备吡非尼酮的标准含药血浆, 浓度分别为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 25.0 μg·mL⁻¹, 按“1.4”项下方法进行操作, 取上清液按“1.2”项下色谱条件进行分析。峰面积比 $A(A=\text{吡非尼酮色谱峰的峰面积}/\text{IS 峰的峰面积})$ 对浓度($C, \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行权重回归计算(权重系数为 $1/C$)。获得的典型回归方程为 $A=0.000\ 7+0.119\ 9C$, $r=1.000$, 结果表明, 吡非尼酮在血浆中的定量下限为 0.2 μg·mL⁻¹, 浓度在 0.2~25.0 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2 不确定度来源分析与评定

2.1 分析不确定度分量

分析在测定全过程中不确定度的来源: 重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(1)$; 天平称量的测量样品和 IS 时引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(2)$; 对照品溶液配制过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(3)$; 配制血浆过程中引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$; 样品处理时, 回收率引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(5)$; 线性拟合过程中引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(6)$; 仪器量化引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(7)$, 见图 1。

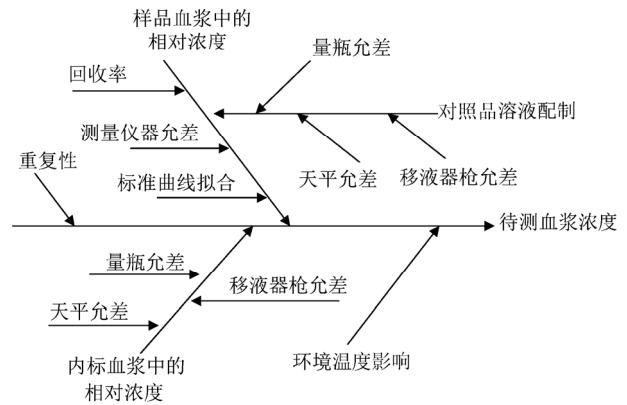


图1 测量不确定度来源分析

Fig. 1 Causality diagram of uncertainty source

2.2 建立数学模型

$$\text{标准曲线公式: } A = \frac{C}{C_{\text{IS}}} = ax + b$$

吡非尼酮最终的血药浓度计算公式: $C=A \times C_{\text{IS}}$

其中: a 为回归方程斜线, b 为回归方程截距; C 为吡非尼酮浓度, A 为标准曲线拟和得到的吡非尼酮与 IS 峰面积比, C_{IS} 内标标识浓度。

2.3 计算各个分量的相对标准不确定度

2.3.1 重复性引入的不确定度 重复性引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(1)$, 用 A 类评定程序。吡非尼酮低(L)、中(M)、高(H) 3 个质控浓度, 分别为 0.5, 2.0, 20.0 μg·mL⁻¹。配制 L、M、H 浓度质控样品 3 份, 平行分别测 5 次。结果见表 1。

表1 吡非尼酮不同浓度的平行性试验

Tab. 1 Repeated measurement concentrations of pirfenidone

μg·mL ⁻¹			
编号	低浓度	中浓度	高浓度
1-1	0.523 5	2.137	19.33
1-2	0.535 3	2.073	19.65
1-3	0.537 5	2.105	19.78
1-4	0.538 0	1.997	20.13
1-5	0.541 6	2.051	20.05
2-1	0.495 2	1.945	19.78
2-2	0.471 1	2.026	20.15
2-3	0.496 5	1.982	20.15
2-4	0.495 6	2.015	20.31
2-5	0.471 2	2.019	20.36
3-1	0.504 2	2.120	19.43
3-2	0.507 1	2.055	19.70
3-3	0.515 9	2.077	19.93
3-4	0.514 5	1.982	20.29
3-5	0.518 0	1.989	20.26

依据贝赛尔公式计算每组单次测量的标准偏差:

$$S_j(x) = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (S_{jk} - \bar{x}_j)^2}{n-1}}$$

其中 $k=3$ 为每组平行测定份数, $j=3$ 为组数, $n=5$ 为每组的个数。经计算 $\bar{x}_L=0.5110 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\bar{x}_M=2.038 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\bar{x}_H=19.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; $S_1(x, L)=0.006916 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $S_2(x, L)=0.01346 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $S_3(x, L)=0.005946 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 3 组标准差得平均值为 $\bar{S}=0.008774 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。则 15 次测量结果的标准不确定度为: $S(\bar{x}, L) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [S_j(\bar{x}, L) - \bar{S}]^2}{m(m-1)}}$, $m=3$

为组数数目。根据下面的公式计算低、中、高浓度质控样品测量结果的相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(1, L) = \frac{S(\bar{x}, L)}{\bar{x}} = 0.004618$; $u_{\text{rel}}(1, M) = \frac{S(\bar{x}, M)}{\bar{x}} = 0.003697$;

$$u_{\text{rel}}(1, H) = \frac{S(\bar{x}, H)}{\bar{x}} = 0.002119。$$

2.3.2 天平称量样品和内标时引入的不确定度 天平称量样品和内标时引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(2)$, 用 B 类评定程序。用天平称量吡非尼酮 10.04 mg , 内标 20.10 mg ; 天平称量的标准测量不确定度为 $u_c(x) = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)}$, $u(\Delta)$ 为天平非线性误差引起的标准测量不确定度; $u(\Delta_0)$ 为天平自动调零引起的标准测量不确定度, $u(\Delta)$ 和 $u(\Delta_0)$ 都按均匀分布考虑, 包含因子 k 取 $\sqrt{3}$, 随机变量半宽 $a=0.5d$, d 为天平分度 (0.01 mg , 根据天平检定证书); 自动调零作为一次扣皮, 其 $a_0=a$, 则 $u(\Delta) = u(\Delta_0)$ 。计算: $u(\Delta) = u(\Delta_0) = a/k = 0.5d/\sqrt{3} = 0.5 \times 0.01/\sqrt{3} = 0.0029 \text{ mg}$, $u_c(x) = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = 0.0041 \text{ mg}$ 。不考虑重复性误差, IS 称量不会引入不确定度, 吡非尼酮称量 10.04 mg , 天平称量的相对标准测量不确定度 $u_{\text{rel}}(2) = \frac{u_c(x)}{\bar{x}} = 0.0041/10.04 = 0.0004$ (样品)。

2.3.3 对照品溶液配制引入的不确定度 对照品溶液配制引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(3)$, 用 B 类评定程序。量瓶定容引入的相对标准不确定度, 实验中配制对照品溶液所用均为 10 mL 量瓶, 其允差为 $\pm 0.020 \text{ mL}$, 室内温度控制为 20°C , 因此温度的影响可不计。按均匀分布, 包含因子 k 取 $\sqrt{6}$, $u_{\text{rel}}(V_{\text{量瓶}}) = a/(k \times \bar{x}) =$

$0.02/(\sqrt{6} \times 10) = 0.0008165$ 。移液管引入的相对标准不确定度, 配制储备液及对照品溶液所用移液管均为 1 mL , 其允差为 $\pm 0.008 \text{ mL}$, 室内温度控制为 20°C , 因此温度的影响可不计。按均匀分布, 包含因子 k 取 $\sqrt{6}$, $u_{\text{rel}}(V_{\text{移液管}}) = a/(k \times \bar{x}) = 0.008/(\sqrt{6} \times 1) = 0.003266$ 。对照品溶液配制引入的相对标准不确定度, 假设稀释的步骤为 5 步, 过程中均用 1 mL 移液枪和 10 mL 量瓶, 其相对标准测量不确定度:

$$u_{\text{rel}}(3) = \sqrt{5 \times 0.0008165^2 + 5 \times 0.003266^2} = 0.007530$$

2.3.4 配制血浆时引入的不确定度 配制血浆时引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(4)$, 用 B 类评定程序。配制血浆时的不确定度主要由过程中使用的移液枪引起, 公式中 a 为最大允差, $\bar{x}$ 为量程, $k=\sqrt{6}$ (按三角形分布)。 1 mL 移液枪的允差为 $\pm 1.0\%$, $200 \mu\text{L}$ 移液枪的允差为 $\pm 1.0\%$, $50 \mu\text{L}$ 允差为 $\pm 1.2\%$ 。它引入的相对标准不确定度: $u_{\text{rel}}(1 \text{ mL}) = a/(k \times \bar{x}) = 1\% / (\sqrt{6} \times 1) = 0.0041$; $u_{\text{rel}}(200 \mu\text{L}) = a/(k \times \bar{x}) = 0.0041$; $u_{\text{rel}}(50 \mu\text{L}) = a/(k \times \bar{x}) = 0.0049$ 。配制血浆时使用 1 mL 的移液枪 1 次, 使用 $50 \mu\text{L}$ 的移液枪 2 次, 则配制血浆时的相对标准不确定度:

$$u_{\text{rel}}(4) = \sqrt{1 \times 0.0041^2 + 2 \times 0.0049^2} = 0.008052$$

2.3.5 样品处理时由回收率引入的不确定度 样品处理时由回收率引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(5)$, 用 A 类评定程序。样品处理过程中, 回收率是引入不确定度的主要因素, 因此重点考察回收率引入的不确定度。将 L、M、H 浓度质控样品进行回收率试验, 平均回收率分别为 (REC_L) 89.5% , 标准偏差为 0.02159 ; (REC_M) 85.6% , 标准偏差为 0.03617 ; (REC_H) 87.8% , 标准偏差为 0.04594 。依据下面的公式计算样品处理时由回收率引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(5)$: n 为计算回收率的样品个数。

$$u_{\text{rel}}(5, L) = SD/(REC_L \times \sqrt{n}) = 0.01079 (n=5)$$

$$u_{\text{rel}}(5, M) = SD/(REC_M \times \sqrt{n}) = 0.01890 (n=5)$$

$$u_{\text{rel}}(5, H) = SD/(REC_H \times \sqrt{n}) = 0.02341 (n=5)$$

2.3.6 线性拟合过程引入的不确定度 线性拟合过程引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(6)$, 用 B 类评定程序。标准曲线包含 7 个浓度, 每个样品峰面积于 IS 峰面积相比得到一个比值, 见表 2。以此比值对样品实际浓度作图, 共拟合 6 条标准曲线, 按照拟合的

标准曲线反算每个对照品血浆的浓度，结果见表3。表中 a 为标准曲线的截距； b 为标准曲线的斜率； r 为标准曲线的相关系数。

表2 HPLC 测得的吡非尼酮在人血浆中的标准曲线($n=6$)
Tab. 2 Calibration curves of prifenidone in plasma by HPLC($n=6$)

加入浓度/ μg·mL ⁻¹	<i>A</i> (<i>A</i> _s / <i>A</i> _i)							
	标曲 1	标曲 2	标曲 3	标曲 4	标曲 5	标曲 6	平均值	
0.2	0.024 2	0.024 5	0.025 4	0.023 7	0.022 4	0.024 9	0.024 2	
0.5	0.057 7	0.061 6	0.059 1	0.061 7	0.058 4	0.067 3	0.061 0	
1	0.117 1	0.121 1	0.119 0	0.123 5	0.118 7	0.120 4	0.120 0	
2	0.233 9	0.236 2	0.245 1	0.248 0	0.241 2	0.265 2	0.244 9	
4	0.483 6	0.467 9	0.468 6	0.486 4	0.487 5	0.453 7	0.474 6	
10	1.204 6	1.194 6	1.159 1	1.240 9	1.258 0	1.292 1	1.224 9	
25	2.819 1	2.992 3	2.833 3	3.056 7	3.096 9	3.060 6	2.976 5	
标曲参数	<i>a</i>	0.001 9	0.000 7	0.003 7	-0.000 3	-0.003 3	0.001 3	0.000 7
	<i>b</i>	0.115 3	0.119 3	0.114 3	0.122 8	0.124 3	0.123 4	0.119 9
	<i>r</i>	0.999 5	1.000 0	0.999 8	1.000 0	0.999 9	0.999 1	0.999 7

表3 根据拟合的标准曲线算出每个对照品血浆的浓度
Tab. 3 Calculated the plasma concentration of each reference substance according to the fitted calibration curves

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	标曲 1	标曲 2	标曲 3	标曲 4	标曲 5	标曲 6
0.2	0.193 0	0.199 9	0.189 8	0.194 9	0.207 5	0.191 9
0.5	0.483 5	0.510 7	0.484 4	0.504 9	0.496 9	0.535 2
1	0.999 4	1.010	1.008	1.008	0.982 4	0.965 5
2	2.012	1.974	2.112	2.022	1.968	2.139
4	4.178	3.917	4.066	3.964	3.950	3.668
10	10.43	10.01	10.10	10.11	10.15	10.46
25	24.44	25.08	24.75	24.90	24.95	24.80

残余标准偏差：

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 2885$$

自相关方差：

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m [y_j - (b_n x_j + a_n)]^2}{N-2}} = 0.01952 (N=42)$$

平均浓度为 $\bar{x}_L = 0.5110 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\bar{x}_M = 2.038 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $\bar{x}_H = 19.95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；平均斜率为 $\bar{b} = 0.1199$ ； $\bar{x}$ 为 7 不同校准对照品溶液的平均值， $\bar{x} = 6.103$ 。

标准测量不确定度分别如下：

$$u(L) = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_L - \bar{x})^2}{S_{xx}}} = \frac{0.01952}{0.1199} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{42} + \frac{(0.5110 - 6.103)^2}{2885}} = 0.05182$$

$$u(M) = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_M - \bar{x})^2}{S_{xx}}} =$$

$$\frac{0.01952}{0.1199} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{42} + \frac{(2.038 - 6.103)^2}{2885}} = 0.05049$$

$$u(H) = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_H - \bar{x})^2}{S_{xx}}} =$$

$$\frac{0.01952}{0.1199} \sqrt{\frac{1}{15} + \frac{1}{42} + \frac{(19.95 - 6.103)^2}{2885}} = 0.06450$$

P ：测定 x_0 的总次数($P=15$)； N ：测定对照品血浆溶液的总次数($N=42$)； i ：下标，指第几个校准溶液； j ：下标，指获得校准曲线的测量次数； $\bar{x}$ ：不同校准对照品溶液的平均值(n 次)； b_n ：每条标准曲线的斜率； a_n ：每条标准曲线的截距； x_0 ：待测血浆样本的浓度(均值)； x_i ：第 i 个对照品血浆溶液的浓度；其相对标准测量不确定度分别如下：

$$u_{\text{rel}}(6, L) = \frac{u(L)}{x_0 L} = 0.05182 / 0.5110 = 0.1014$$

$$u_{\text{rel}}(6, M) = \frac{u(M)}{x_0 M} = 0.05049 / 2.038 = 0.02477$$

$$u_{\text{rel}}(6, H) = \frac{u(H)}{x_0 H} = 0.06450 / 19.95 = 0.003232$$

2.3.7 仪器量化引入的不确定度 仪器量化引入的不确定度 $u_{\text{rel}}(7)$ ，用 B 类评定程序。根据使用实验室不同检测仪器，其相对标准测量不确定度为：安捷伦 1200 HPLC，该仪器测量的定量允差为 1%，按均匀分布，其标准不确定度：

$$u_{\text{rel}}(7) = \frac{1}{100 \times \sqrt{3}} = 0.005774$$

2.3.8 样品不均匀性和对照品纯度引入的测量不确定度 配制的样品都为液态物质，且混合均匀，故样品不均匀性引入的测量不确定度不计。对照品纯度未提供不确定度，视为真实值，故引入的测量不确定度视为零。

2.4 计算合成标准测量不确定度

根据不确定度传播定律对各相对标准不确定度进行合成，则该药血浆中浓度的合成相对标准测量不确定度：

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

该药血浆中 L、M、H 浓度质控样品测定的合成相对标准测量不确定度：

$u_{c, \text{rel}, L}=0.102\ 8$; $u_{c, \text{rel}, M}=0.033\ 76$; $u_{c, \text{rel}, H}=0.026\ 79$

L、M、H 浓度质控样品测定的合成标准测量不确定度:

$$u_{c, L}=u_{\text{rel}} \times C=0.102\ 8 \times 0.511=0.052\ 55\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u_{c, M}=u_{\text{rel}} \times C=0.033\ 76 \times 2.038=0.068\ 80\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$u_{c, H}=u_{\text{rel}} \times C=0.026\ 79 \times 19.95=0.534\ 5\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.5 计算扩展不确定度

用简易评定方法, 取 $k=2$, 此时对应的置信概率为 95%, 得到扩展不确定度:

$$U_L=2 \times u_{c, L}=0.105\ 1\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$U_M=2 \times u_{c, M}=0.137\ 6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

$$U_H=2 \times u_{c, H}=1.069\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$$

2.6 测定结果的表示

血浆中吡非尼酮 L、M、H 浓度质控的测定结果分别表示为 $(0.511\ 0 \pm 0.105\ 1)$ 、 $(2.038 \pm 0.137\ 6)$ 、 $(19.95 \pm 1.069)\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

医学实验室能力认可准则: 国际标准 ISO 17025 中对测量不确定度的评定提出了明确的要求。在评定测量不确定度过程中, 需要考察并分析其检测的全过程, 明确检测过程中不确定度的来源, 才能确保评定的全面性及准确性。本研究通过整体全面分析了 HPLC 测定血浆中吡非尼酮浓度的实验流程, 明确了其建立检测方法中不确定度的来源, 量化了不确定度的各分量, 最后进行合成并扩展。结果表明, 标准曲线的拟合过程对测量不确定度的影响相对较大, 尤其是 L 浓度。因此, 在实验过程中, 需要优先选择灵敏度较高的检测仪器, 以及在线性回归时需要选择合适的权重, 才能确保 L 浓度检测的准确性。在所建立的检测方法中, 天平称量样品时, 引入的不确定度非常小, 可忽略不计, 分析因为采用

了高精度的电子天平(十万分之一), 故减小了称量引入的误差。

本研究通过对 HPLC 测定血浆中吡非尼酮浓度的测量不确定度进行评定, 列出并分析造成结果变异的所有因素, 且逐一评定其可能对结果造成的影响, 说明不确定性的范围, 最终得出此结果的可靠性程度。为后期合理地改善分析方法, 进一步提高分析质量提供依据。

REFERENCES

- [1] CHEN M C, WANG M H, CAO Q. Determination of pirfenidone in human plasma by HPLC [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2013(6): 473-476.
- [2] 国家质量技术监督局. 测定不确定度评定与表示[S]. JJF1 059.1-2012.2012.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. 测量结果的溯源性要求[S]. CNAS-GL06. 2014.
- [4] 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: 1578-1580.
- [5] LI J K, LI Y, CHEN M C, et al. Uncertainty evaluation for the determination of repaglinide in human plasma by LC-MS/MS [J]. Accred Qual Assur, 2013, 18(1): 61-70.
- [6] HUANG W C, CHEN Y Q, SHANG D W. Uncertainty evaluation of the determination of lamotrigine in human serum by HPLC [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2017, 33(22): 2295-2298.
- [7] XIE S F, ZOU S, HUANG J Z. Uncertainty evaluation for the determination of levodopa methyl ester hydrochloride concentration in human plasma by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(8): 994-1000.
- [8] CHENG Y, LI T, WANG H Y. Uncertainty evaluation on the concentration of potassium dichromate volumetric solution [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(1): 90-92.
- [9] YANG M. Uncertainty assessment for the assay determination of methylprednisolone sodium succinate for injection by UPLC [J]. Pharm Today(今日药学), 2019, 29(3): 182-185.

收稿日期: 2019-03-21

(本文责编: 沈倩)