

# HPLC-MS/MS 法测定人血中阿普唑仑浓度的不确定度评定

季顺兵 (苏州华碧微科检测技术有限公司, 江苏 苏州 215000)

**摘要:** 目的: 通过对测定人血中阿普唑仑浓度时分析步骤中引入不确定度分量的评定, 加强对各步骤的监督管理, 提高实验数据的质量。方法: 通过分析液质联用法测定人血中阿普唑仑的浓度时, 前处理步骤及曲线拟合中的不确定度来源, 计算不确定度分量并进行合成和扩展。结果: 人血中阿普唑仑的浓度在 100ng/mL 下的扩展不确定度为 5.86ng/mL ( $P=95\%$ ,  $k=2$ ) 结论: 液质联用法测定人血中阿普唑仑浓度时, 在 25ng/mL~400ng/mL 范围内的不确定度主要由标准曲线拟合, 进样的重复性以及标准品溶液制备引入的。

**关键词:** 不确定度; 液质联用; 阿普唑仑

## 1 仪器与试剂

LC-20A 高效液相色谱仪 (日本岛津), API4000 三重四级杆质谱仪 (AB SCIEX), 湘仪高速离心机 (HT16MM), BRAND 移液器, 纯水器 (Millipore)。阿普唑仑 (批号: 118.1B0.1L7, Lipomed, 含量 1.0mg/mL), 内标 (批号: FE07061501, Cerilliant) 甲醇为色谱纯 (Merk), 甲酸为质谱级 (Fisher), 超纯水为自制的。

## 2 方法和结果

### 2.1 色谱条件和质谱条件

色谱条件: 色谱柱为 AllurePFPPropyl(100mm × 2.1mm × 5 μm), 流动相: A: (10mmol 乙酸铵, 0.1% 甲酸) 水溶液, B: 乙腈, 流动相 A: 流动相 B=30:70, 流速: 0.2mL/min, 柱温: 常温进样量: 10 μL。质谱条件: 质谱离子化方式为 ESI<sup>+</sup>, 阿普唑仑和内标在 MRM 模式下的定量离子对是:  $m/z309.1 > 205.0$ ;  $m/z309.1 > 281.2$ 。

### 2.2 测试原理

样品经调 pH、涡旋萃取、富集复溶后, 导入液相色谱-串联质谱联用仪中, 利用母离子/定量离子对 (237.0/194.1) 响应值的峰面积与内标地西洋-D5 的峰面积比, 随其含量的增加成正比, 与标准系列比较来进行定量分析。

### 2.3 测试过程

用移液器移取血液样本 1mL, 加入 10 μL 的地西洋-D5 内标 (1 μg/mL), 2mL pH9.2 硼酸钠缓冲液, 混匀后加入 3mL 乙醚进行萃取。取乙醚层 1.5mL 水浴挥干 (60℃) 后加复溶液 100 μL 溶解进样。同时做出方法空白。

### 2.4 测量流程示意图 (如图 1)

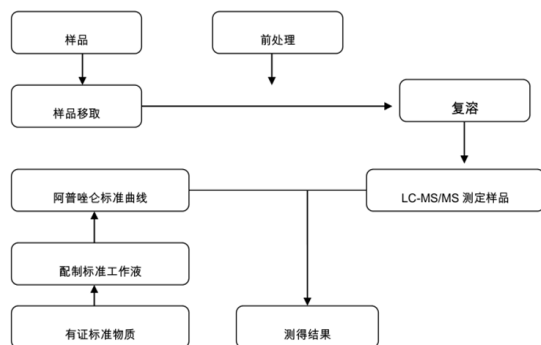


图 1 测量流程示意图

## 3 建立数学模型

阿普唑仑的含量:

$$C = \frac{Y-a}{b}$$

式中:

C- 阿普唑仑的含量, 单位为 ng/mL;

Y- 待测样品中阿普唑仑与内标峰面积比;

a- 线性方程的截距;

b- 线性方程的斜率。

## 4 测量不确定度的评定

### 4.1 重复性引起的测量不确定度 (A 类评定程序)

取 100ng/mL 血液质控品 1 组, 平行测试 6 次 ( $n=6$ ), 见表 1。计算:

表 1

|               | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 含量<br>(ng/mL) | 100.4 | 101.2 | 103.3 | 104.8 | 102.5 | 101.5 |

样品标准差 S:

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\alpha - \bar{\alpha})^2 / (n-1)}$$

质控的相对标准测量不确定度为:

$$u_r = S / \bar{\alpha}$$

根据 (1) 算出结果:

$$S=1.458\text{ng/mL}; \bar{\alpha}=102.3\text{ng/mL}$$

所以质控品的相对测量不确定度为:

$$u_r=0.0143$$

### 4.2 标准溶液的不确定度

阿普唑仑标准溶液 (1mg/mL) 为 Cerilliant 提供, 质量浓度为 1000 μg/mL, 标准证书给出扩展不确定度为 0.006mg/mL,  $k=2$ , 则阿普唑仑标准溶液的标准不确定度为:

$$u(\rho) = 0.006\text{mg/mL} / 2 = 0.003\text{mg/mL}$$

$$u_{\text{rel}}(\rho) = u(\rho) / \rho = 0.003\text{mg/mL} / 1\text{mg/mL} = 0.003$$

### 4.3 标准品工作液制备过程引入的不确定度

#### 4.3.1 稀释过程:

用 100 μL 移液器移取 40 μL 阿普唑仑标准溶液, 置于 10mL 容量瓶 (A 级) 中, 用甲醇定容至刻度, 即为 4 μg/mL 阿普唑仑储备液。1000 μL 移液器移取 1000 μL 阿普唑仑储备液, 置于 10mL 容量瓶 (A 级) 中, 用甲醇定容至刻度, 即为 400ng/mL 阿普唑仑标准使用液; 用

1mL 移液器移取 800  $\mu$ L 甲醇和 800  $\mu$ L 的 400ng/mL 阿普唑仑标准使用液, 混匀后即得 200ng/mL 阿普唑仑标准使用液; 同法稀释, 依次得到 100ng/mL、50ng/mL、25 ng/mL、阿普唑仑标准使用液。以上各标准液平行制备 2 份, 每一个点取对应浓度标准工作液 100  $\mu$ L, 内标工作液 10  $\mu$ L。共使用 1mL 移液器 9 次, 100  $\mu$ L 移液器 13 次, 10mL 容量瓶 4 次, 10  $\mu$ L 移液器 10 次。

#### 4.3.2 移液器引入的不确定度: (B 类评定)

根据计量报告给出的测量不确定度, 计算出相对测量不确定度结果见下 (表 2):

表 2

|                  | 证书号                   | 测量不确定度 ( $\mu$ L) | k 值 | 相对测量不确定度 |
|------------------|-----------------------|-------------------|-----|----------|
| 10 $\mu$ L 移液器   | 801102302-002         | 0.014             | 2   | 0.0007   |
| 100 $\mu$ L 移液器  | J201808105611-01-0001 | 0.6               | 2   | 0.003    |
| 1000 $\mu$ L 移液器 | 801246892-002         | 3                 | 2   | 0.0015   |

#### 4.3.3 容量瓶引入的不确定度: (B 类评定)

所用的容量瓶 (F) 规格均为 10mL, 其最大允差为  $\pm 0.020$ mL。按照三角分布, 包含因子  $k=\sqrt{6}$ , 相对测量不确定度为:

$$u_r(F_{10\text{mL}})=0.02/(\sqrt{6} \times 10)=0.00082$$

#### 4.3.4 标准品工作液制备引入的不确定度:

由于内标的制备不影响阿普唑仑的测定, 则标准工作液引入的测量不确定度:

$$u_r(\text{std})=\sqrt{9 \times 0.0015^2 + 13 \times 0.003^2 + 10 \times 0.0007^2 + 4 \times 0.00082^2 + 0.003^2}=0.0124$$

#### 4.4 含阿普唑仑标准样品的制备引入的不确定度 (B 类评定)

含阿普唑仑标准样品 (S) 制备所用的移液器型号和次数为: 10  $\mu$ L 移液器吸取 10  $\mu$ L 计 2 次, 100  $\mu$ L 移液器吸取 100  $\mu$ L 计 2 次, 则配制含阿普唑仑标准样品的相对标准测量不确定度为:

$$u_r(S)=\sqrt{2 \times 0.003^2 + 2 \times 0.0007^2}=0.00436$$

#### 4.5 仪器量化引入的测量不确定度 (B 类评定)

根据仪器性能及质谱仪和液相模块的最大允差均为 1%, 按照矩形分布, 包含因子  $k=\sqrt{3}$ , 则仪器量化引入的相对标准测量不确定度  $u_r(E)$  为:

$$u_r(E)=\sqrt{u_r^2(MS)+u_r^2(LC)}=\sqrt{\left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2+\left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2}=0.0082$$

#### 4.6 拟合曲线计算引入的测量不确定度 (B 类评定)

标准曲线包括了 5 个浓度, 用阿普唑仑峰面积与内标峰面积的比值对阿普唑仑浓度进行线性拟合, 权重因子为  $1/x^2$ , 标准曲线中用拟合的标准曲线计算得到的含阿普唑仑标准样品的浓度见下表:

表 3

| 标点 | 理论值 (ng/mL) | 曲线 1  | 曲线 2  | 均值 |
|----|-------------|-------|-------|----|
| S1 | 25          | 24.56 | 25.11 | \  |
| S2 | 50          | 52.23 | 53.12 | \  |
| S3 | 100         | 100.7 | 101.2 | \  |

|      |     |        |        |         |
|------|-----|--------|--------|---------|
| S4   | 200 | 199.7  | 198.6  | \       |
| S5   | 400 | 393.5  | 395.4  | \       |
| 斜率   |     | 0.9792 | 0.9815 | 0.0164  |
| 截距   |     | 2.7571 | 2.9908 | 0.00499 |
| 相关系数 |     | 0.9998 | 0.9999 | \       |

本实验对样品测定液进行了 6 次测量, 由直线方程求得平均质量浓度  $C_0=101.5$ ng/mL, 则  $C_0$  标准不确定度:

$$u(C_0)=\frac{s(y)}{b}\sqrt{\frac{1}{p}+\frac{1}{n}+\frac{(C_0-\bar{C})^2}{S_{cc}}}=297.3534\text{ng/mL}$$

式中:

$$s(y)=\sqrt{\frac{1}{n-2}\sum_{j=1}^n[y_j-(a+bC_j)]^2}=24.1855\text{ng/mL}, \text{标准溶液响}$$

应值的残差的标准差;

$$\bar{C}=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^nC_j=\frac{1}{n}\sum_{j=1}^nC_j=178798.2\text{ng/mL}, \text{标准溶液平均浓度};$$

$$S_{cc}=\sum_{j=1}^n(C_j-\bar{C})^2=1414.5841, \text{标准溶液质量浓度的残差}$$

的平方和;

$n$ - 标准溶液的测量次数, 本实验为 10;

$p$ - $C_0$  的测量次数, 本实验为 6。

则:

$$u_{rel}(C_0)=u(C_0)/C_0=297.3534 \mu\text{g/mL}/101.5 \mu\text{g/mL}=2.93$$

#### 4.7 试剂空白

本实验所用试剂为分析纯, 因扣除空白所致的微小变化产生的影响忽略不计。

#### 4.8 基质效应

实验所制得标准曲线点均随添加标准质控样品一同进行前处理, 所用基质均为血液基质, 故因基质产生的影响忽略不计

#### 5 结果

当包含概率  $P=95\%$ ( $k=2$ ), 血液中阿普唑仑标品添加质控的测定结果表示为:

$$C_{qc}=101.5 \pm 5.86\text{ng/mL}; k=2$$

#### 6 分析与讨论

由计算结果分析可知, 在实验过程中标准曲线是引起结果偏差的主要因素。虽然已经使用内标法对检测过程中的系统误差进行控制, 相较于其他不确定度分量来说, 依然占据了较大比重。由此, 在进行实验检测中, 标准曲线拟合的步骤是需要重点监控和注意的对象。

#### 参考文献:

- [1] 陈建琴. 液质联用法测定川楝子中川楝素含量的不确定度评价 [J]. 中国药师, 2014, 17(8):1417-1419.
- [2] 曹国颖, 齐文渊, 张帅, 等. LC-MS/MS 法测定人血浆中齐多夫定浓度的不确定度评价 [J]. 中国药房, 2014, 25(38):3595-3599.

#### 作者简介:

季顺兵 (1989-), 男, 汉族, 籍贯: 江苏苏州, 学历: 本科, 职称: 助理工程师, 研究方向: 司法鉴定。