

高效液相色谱质谱联用法测定人粪便中匹诺塞林浓度的不确定度评定

严蓓¹ 曹国颖¹ 闫记灵² 彭悦颖² 边子睿² 李可欣^{1*}

1 卫生部北京医院药理学部临床药理室, 药物临床风险与个体化应用评价北京市重点实验室 (北京 100730)

2 石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司(石家庄 050051)

【摘要】 目的: 对人粪便中匹诺塞林浓度的高效液相色谱质谱联用(LC-MS/MS)定量分析方法的测量不确定度进行评定。方法: 分析人粪便中匹诺塞林浓度测定过程, 确定并简化不确定度来源, 利用 LC-MS/MS 测定人粪便中匹诺塞林的方法学验证数据, 通过统计学方法, 依次计算各变量的不确定度、合成不确定度和扩展不确定度。结果: 人粪便中低($51.07 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中($510.44 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高($2957.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)质量浓度匹诺塞林的扩展不确定度分别为 $14.58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $26.30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $206.46 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($k=2$, 置信概率为 95%)。结论: 测量不确定度与检测结果数值相关, 随浓度高低不同而有所差异, 而且测定不确定度比例在匹诺塞林不同浓度的结果也不相同, 标准曲线拟合对低浓度点的影响非常大。

【关键词】 LC-MS/MS; 匹诺塞林; 粪便; 不确定度

【中图分类号】 R917

【文献标志码】 A

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2014.02.008

Evaluation of Uncertainty for the Determination of Pinocembrin in Human Feces by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

YAN Bei¹ CAO Guo-ying¹ YAN Ji-ling² PENG Yue-ying² BIAN Zi-rui² LI Ke-xin¹. 1 Department of clinical Pharmacology, Beijing hospital, Beijing 100730, China; 2 Shijiazhuang Pharmaceutical Group Co. Ltd. Zhongqi Corporation, Shijiazhuang 050051, China.

【Abstract】 **Objective:** To set out the procedures for evaluation of measurement uncertainty for the determination of pinocembrin in human feces by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods:** Detection process was analyzed. Uncertainty sources were established and simplified, then calculated each component of uncertainty, combined uncertainty and expanded uncertainty. **Results:** The expand uncertainty of pinocembrin with low ($51.07 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), medium ($510.44 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and high ($2957.50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) concentration was $14.58 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, $26.30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $206.46 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively ($k=2$, confidence probability was 95%). **Conclusions:** Uncertainty for the determination of pinocembrin in human feces was related to the detecting data, and the proportion of uncertainty was different in low, medium and high concentration. The standard curve fitting had a great influence on the uncertainty at the low level of pinocembrin.

【Keywords】 LC-MS/MS; Pinocembrin; Feces; Uncertainty

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项心脑血管疾病新药临床评价技术平台研究(2012ZX09303008-002); 国家自然科学基金(81202601)

* 通讯作者: 李可欣 E-mail: kexinli6202@163.com

匹诺塞林是蜂胶中含量最高的黄酮类化合物。不仅具有神经细胞保护作用,而且对脑缺血后血管系统与神经组织之间的损伤级联反应具有广泛的抑制作用^[1-4],有希望成为新一类的“神经血管单元保护剂”。匹诺塞林注射粉针剂属化学药品注册分类 1.1 类新药,现经国家食品药品监督管理总局批准进行 I 期临床试验,为此,必须首先建立测定人生物基质中匹诺塞林浓度的方法,用于评价匹诺塞林人体内的药动学特征,然而仅查阅到个别血浆的测定方法^[5],未见尿液或粪便的测定方法。粪便中匹诺塞林含量的测定对于评价匹诺塞林的人体内排泄具有重要意义,本实验室首次建立了高效液相色谱质谱联用(LC-MS/MS)测定人粪便中匹诺塞林浓度的方法^[6]。为了控制检测质量,本实验根据“CNAS-CL01 检测和校准实验室能力认可准则”中的要求,以不确定度的相关理论教材为指导,评定 LC-MS/MS 测定粪便中匹诺塞林的不确定度^[7]。

1 材料

1.1 试剂

匹诺塞林对照品(石药集团中奇制药技术(石家庄)有限公司,批号:100101,纯度 99.2%)。内标氯硝西洋对照品(中国食品药品检定研究院,1227-9701)。乙腈、甲醇为色谱纯。超纯水(18.2 MΩ·cm, 25℃)由 Milli-Q® A10 Synthesis 纯化系统制备(Millipore 公司,美国)。空白粪便由健康志愿者提供。

1.2 仪器

SHIMADZU 20AD 高效液相色谱仪(岛津公司,日本);AB Qtrap 5500 质谱检测器仪和 AnalystTM 1.5.1 数据处理系统(AB 公司,美国);XP205 分析天平(METTLER-TOLEDO 公司,瑞士);HR2094 搅拌机(飞利浦,荷兰)。

2 方法

2.1 检测条件

Luna™ C₈ 色谱柱(2.00mm × 150 mm, 3μm,

Phenomenex 公司,美国);流动相:乙腈和含 0.3mmol·L⁻¹ 醋酸铵的水溶液(65:35);流速:恒定为 0.25mL·min⁻¹;柱温:40℃;进样量:5μL;ESI 电离源负离子检测;多反应离子监测(MRM);匹诺塞林定量分析的离子反应为 m/z 255.0 → 171.1,电喷雾电压、去簇电压、碰撞室电压和碰撞能量分别为 -4500V、-100V、-34V 和 -22V。

2.2 对照品溶液的配制

精密称量 10mg 的匹诺塞林对照品,甲醇溶解、稀释,并于 50mL 容量瓶中定容,得到浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的储备液。用逐级稀释的方法,使用移液器,用甲醇稀释得到一系列浓度分别为 160、120、80、40、20、8、4、2、1.2 μg·mL⁻¹ 的工作液。

精密称量氯硝西洋对照品 5mg,甲醇溶解、稀释,并于 50mL 容量瓶中定容,得到浓度为 100 μg·mL⁻¹ 储备液,用甲醇稀释得 24 μg·mL⁻¹ 的内标工作液。

2.3 含药标准粪便的配制

吸取 10μL 系列浓度的匹诺塞林工作液于离心管中,然后分别加入 400μL 的人空白粪便匀浆液(空白人粪便称重后,加入 4 倍量的超纯水,于搅拌机中匀浆 10min),混匀,配制一系列质量浓度分别为 30、100、200、500、1 000、2 000、4 000ng·mL⁻¹ 的粪便标准曲线。同法配制 50ng·mL⁻¹(低质控, L)、500ng·mL⁻¹(中质控, M)、3 000ng·mL⁻¹(高质控, H)的标准粪便质控样品。

2.4 粪便样品预处理

于含药标准粪便样品中加入 10μL 内标工作液,涡旋混匀。加入 1 400μL 乙腈,震荡 3min,离心(13 000 r·min⁻¹) 5min 后转移上清液 15μL,加入 785μL 65% 乙腈,混合、离心后转移上清进样。

2.5 样品浓度检测与计算

以样品峰面积与内标峰面积比(y)对样品的浓度(x)进行线性回归,得回归方程 $y=ax+b$ (a , b 分别为标准曲线的斜率和截距)。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 ($x = \frac{y-b}{a}$)。

2.6 不确定度分量的分析和评定

2.6.1 A 类不确定度评定 $u_r(\text{Rep})$ 由重复性测定 (精密度) 引入的不确定度属于 A 类不确定度。配制粪便的标准曲线和质控样品 (每个浓度各 5 份, 即 $n=5$)，测定质控样品的浓度，重复进行 3 组 ($m=3$) 这样的操作。

依据贝塞尔公式计算合并样本偏差：

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

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

以每组 5 个值的平均值表示测量结果，则

平均值的标准偏差： $S_p(\bar{x}) = \frac{S_p(x)}{\sqrt{mn}}$

重复性引入的相对标准不确定度： $u_r(\text{Rep}) = \frac{S_p(\bar{x})}{\bar{x}_{\text{total}}}$ 其中 \bar{x}_{total} 为 $m \times n$ 个 (本实验为 15 个) 标准粪便样品浓度的平均值。

2.6.2 B 类不确定度评定 ①对照品称量引入的不确定度 $u_r(W)$ 采用减重法称量。电子天平 $e=0.1\text{mg}$ ，天平的非线性误差： $u(\text{nonlinear}) = \frac{a}{k} = \frac{0.5e}{\sqrt{3}}$ 。天平自动调零引起的误差： $u(\text{zeroing}) = \frac{a_0}{k_0}$ 。天平的标准不确定度： $u_c(W) = \sqrt{u^2(\text{nonlinear}) + u^2(\text{zeroing})}$ 。称量 10mg 匹诺塞林的相对标准不确定度为 $u_r(W_1) = \frac{u_c(W)}{W_1}$ ，称量 5mg 内标的相对标准不确定度为 $u_r(W_2) = \frac{u_c(W)}{W_2}$ 。

称量引起的相对标准不确定度：

$$u_r(W) = \sqrt{u_r^2(W_1) + u_r^2(W_2)}$$

②配制对照品溶液时引入的不确定度 $u_r(\text{Sol})$ 配制储备液的 50mL (\bar{x}_v) 容量瓶的最大允许误差为 $\pm 0.050 \text{ mL}$ (a_v)。按三角分布 ($k = \sqrt{6}$)，容量瓶的相对标准不确定度：

$$u_r(V) = \frac{a_v}{k \bar{x}_v}$$

使用量程范围为 100~1 000 μL 的移液器 (Transferpette®S 手动半支消毒移液器, BRANDS, 德国) 配制标准溶液，每次吸取的体积为 \bar{x}_1 。该移液器最大允许误差为 $\pm 0.6\%$

($a_1 = 0.006 \bar{x}_1$)。按三角分布 ($k = \sqrt{6}$)，100~1 000 μL 移液器的相对标准不确定度： $u_r(P_1) = \frac{a_1}{k \bar{x}_1}$

考虑到操作次数 (称量匹诺塞林和内标各用了 1 个容量瓶，共 2 个；逐级稀释配制匹诺塞林工作液用了 18 次移液器，内标工作液用了 2 次移液器，共用 20 次) 时，配制溶液引入的对标准不确定度： $u_r(\text{Sol}) = \sqrt{2 u_r^2(V) + 20 u_r^2(P_1)}$

③制备含药标准粪便样品时引入的不确定度 $u_r(\text{Sam})$ 含药标准粪便是由 400 μL 空白粪便匀浆、10 μL 匹诺塞林工作液和 10 μL 内标工作液混合而成，其不确定度主要由移液器引起。量程范围是 100~1 000 μL 的移液器 (最大允许误差为 $\pm 0.6\%$) 吸取空白粪便匀浆，吸取的体积为 \bar{x}_1 ，量程范围是 2~20 μL (最大允许误差为 $\pm 0.8\%$) 吸取工作液，吸取的体积为 \bar{x}_2 。按三角分布 ($k = \sqrt{6}$)，移液器的相对标准不确定度：

$$u_r(P_1) = \frac{a_1}{k \bar{x}_1}, u_r(P_2) = \frac{a_2}{k \bar{x}_2}$$

配制含药标准粪便样品时的相对标准不确定度： $u_r(\text{Sam}) = \sqrt{u_r^2(P_1) + u_r^2(P_2) + u_r^2(P_2)}$

④样品提取引入的不确定度 $u_r(R)$ 平行配制 50、500、3 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粪便样品各 6 份 ($n=6$)，测得的峰面积设为 B ；另取 6 份来自于不同个体的空白粪便匀浆适量，处理后加入匹诺塞林标准工作液适量配制成质量浓度分别为 50、500、3 000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液，测得的峰面积设为 A 。则回收率 $R = B/A \times 100\%$ ，回收率的标准偏差为 SD 。

$$\text{回收率的相对标准不确定度: } u_r(R) = \frac{SD}{R\sqrt{n}}$$

⑤ LC-MS/MS 量化测定引入的不确定度 $u_r(E)$ AB Qtrap 5 500 质谱检测仪定量的最大允差为 1% ($a = 0.01 \bar{x}$)，按均匀分布 ($k = \sqrt{3}$)，其相对不确定度： $u_r(E) = \frac{a}{k \bar{x}}$

⑥线性回归过程引入的不确定度 $u_r(\text{Cal})$ 配制粪便样品标准曲线样品，提取后检测，每个浓度测量 3 次，共测得 21 对值，即匹诺塞林峰面积和内标峰面积比 y 值。用每个标准粪便样品 y 的平均值对浓度进行线性回归，得回归方程。

$$\text{残余标准偏差: } S = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N [y_j - (ax_j + b)]^2}{N-2}}$$

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

标准不确定度: $u(x) = \frac{S}{a} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x} - \bar{x}_{\text{total}})^2}{S_{xx}}}$

公式中, 回归方程斜率 $a=0.001\ 702$ 、截距 $b=0.005\ 550$; P 为测定 x 的总次数 ($P=15$); N 为测定标准粪便样品的总次数 ($N=m \times n=7 \times 3=21$); J 为测定的序数 ($J=1、2、3 \cdots N$); i 为标准粪便样品的序数 ($i=1、2、3、4、5、6、7$); \bar{x}_{total} 为 $m=7$ 个标准粪便样品浓度的平均值; x_i 为第 i 个样品的浓度; 低、中、高质控相对应的 \bar{x}_i 分别为 $51.07 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $510.44 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $2\ 957.50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

则其相对标准不确定度: $u_r(C) = \frac{u(x)}{\bar{x}}$

2.6.3 合成不确定度的评定

$u_r(X) = \sqrt{u_r^2(\text{Rep}) + u_r^2(W) + u_r^2(\text{Sol}) + u_r^2(\text{Sam}) + u_r^2(R) + u_r^2(E) + u_r^2(C)}$

匹诺塞林浓度测定的标准不确定度为:

$u_c(x) = u_r(x) \times \bar{x}$

2.6.4 扩展不确定度的评定

取 $k=2$, 此时对应的置信概率为 95%, 匹诺塞林浓度测定的扩展不确定度: $U = k \times u_c(x)$

3 结果

3.1 A 类不确定度结果

重复性测定 (精密度) 的结果见表 1。

低、中、高质控水平重复性测定结果的相对标准不确定度:

$u_r(\text{Rep}_L)$ 为 0.0082, $u_r(\text{Rep}_M)$ 为 0.0092, $u_r(\text{Rep}_H)$ 为 0.010

3.2 B 类不确定度结果

①称量引入的相对标准不确定度: $u_r(W)$ 为 0.0092

②配制对照品溶液时引入的相对标准不确定度: $u_r(\text{Sol})$ 为 0.011

③制备含药标准粪便样品时引入的相对标

准不确定度: $u_r(\text{Sam})$ 为 0.0052

④样品提取引入的相对标准不确定度: 低浓度的平均提取回收率 (\bar{R}_L) 和回收率的标准偏差 (SD_L) 分别为 109.60% 和 5.07%, 中浓度的 \bar{R}_M 和 SD_M 分别为 97.52% 和 3.02%, 高浓度的 \bar{R}_H 和 SD_H 分别为 94.56% 和 6.68%。计算得低、中、高质控水平回收率的相对标准不确定度: $u_r(R_L)$ 为 0.019, $u_r(R_M)$ 为 0.013, $u_r(R_H)$ 为 0.029。

⑤ LC-MS/MS 量化测定引入的相对标准不确定度: $u_r(E)$ 为 0.0058

⑥线性回归过程引入的相对标准不确定度: 线性回归引入的低、中、高质控水平的相对标准不确定度: $u_r(C_L)$ 为 0.14, $u_r(C_M)$ 为 0.012, $u_r(C_H)$ 为 0.0033。

3.3 合成不确定度

低、中、高质控水平匹诺塞林测定浓度的标准不确定度: $u_c(x_L)$ 为 $7.28 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $u_c(x_M)$ 为 $13.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, $u_c(x_H)$ 为 $103.23 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 扩展不确定度 ($k=2$, 置信概率为 95%)

低、中、高质控水平匹诺塞林测定浓度的扩展不确定度:

U_L 为 $14.58 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, U_M 为 $26.30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, U_H 为 $206.46 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

3.5 各质控水平匹诺塞林浓度测定结果

人类便中低、中、高质控水平匹诺塞林的测定质量浓度分别为 (51.07 ± 14.58) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、(510.44 ± 26.30) 和 ($2\ 957.50 \pm 206.46$) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($k=2$, 置信概率为 95%)。

3.6 匹诺塞林测定浓度的不确定度分量统计图

不确定度分量的统计直方图见图 1。图中可以看出, 低质控的不确定度 (由大到小) 依次是由标准曲线拟合、样品提取、溶液配制、称量、重复性、LC-MS/MS 测定、标准含药粪便的制备引入, 中质控的不确定度 (由大到小) 依次是由样品提取、标准曲线拟合、溶液配制、重复性、称量、LC-MS/MS 测定、标准含药粪便的制备引入, 高质控的不确定度 (由大到小) 依次是由样品提取、溶液配制、重复性、称量、

表 1 匹诺塞林重复性测定浓度 / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

质控水平	第 1 组	第 2 组	第 3 组	总平均值
	平均值 ($n=5$)			($n=15$)
低	48.39	51.22	53.62	51.07
中	493.95	509.64	527.73	510.44
高	2 761.20	3 043.32	3 067.98	2 957.50

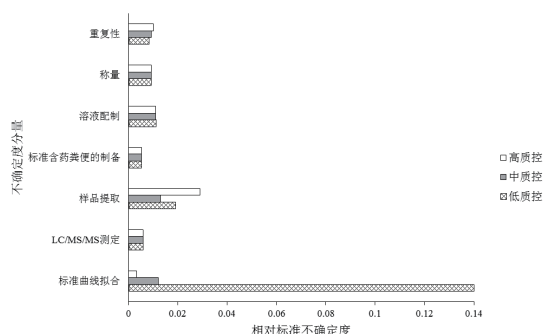


图 1 不确定度分量的统计直方图

LC-MS/MS 测定、标准含药粪便的制备、标准曲线拟合引入，此外，标准曲线拟合和样品提取是造成不同质控水平匹诺塞林的不确定度不一致的主要因素。

4 讨论

生物样本中药物测定步骤中每一个因素都会影响不确定度，由于生物样本处理步骤繁琐，干扰因素较多，所以考虑了主要影响因素，包括对照品称量、溶液配制、标准生物样品的制备、样品的提取、仪器测定、标准曲线的拟合、重复性、温度等。因为匹诺塞林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，且匹诺塞林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可忽略不计；由于标准溶液为液态样品，标准溶液在容量瓶中充分混匀，空白粪便与工作液和内标体积较小且用涡旋振荡器充分混合 30s，所以对对照品工作液和由含药粪便样品不均匀性很小，带来的不确定度非常小，在本实验也被忽略。

本实验结果显示测量不确定度是与检测结果数值相关的，它随浓度高低不同而有所差异，重复性（精密度）、回收率和线性回归是造成 3 个浓度水平不确定度不一致的主要因素。此外，测定不确定度比例在不同浓度水平的结果也不相同，浓度越低不确定度值比例越大。

不确定度直方图直观展示了各浓度不确定度的分量值。根据^[8]之前的经验，本实验尽量使用同一规格的量器配制溶液（如配制标准曲线时使用同一规格的移液器），使得溶液配制的不确定度分量大大降低。低浓度水平中标准

曲线拟合的不确定度是主要的不确定度来源，其次是样品提取；中浓度和高浓度水平中样品提取的不确定度是主要的不确定度来源。标准曲线拟合对低浓度点的影响非常大，这与标准曲线范围、测定点的个数和重复测定次数密切相关，不同权重的回归也会对结果造成影响（笔者未列出具体的数据），提示在进行粪便样品浓度检测时，为保证低浓度点的准确性，在遵守国家食品药品监督管理总局发布的“化学药物临床药代动力学研究技术指导原则”的前提下选择最佳的标准曲线范围、标准点个数和权重回归方法，将低浓度点的不确定度降到最小。此外，样品提取是测定生物样品中药物浓度非常关键的步骤，结果提示应当提高样品提取的回收率、重复性，建议选择回收率高、干扰小、经济、简单的提取方法。同时应当加强技术人员的操作水平和技术培训，如在生物样品检测方法学建立后立刻制定标准操作规程，对技术人员进行培训，要求其严格按照标准操作规程进行实验操作等，尽量减少操作造成的影响。

【参考文献】

- [1] Meng F, Liu R, Gao M, et al. Pinocembrin attenuates blood-brain barrier injury induced by global cerebral ischemia-reperfusion in rats[J]. Brain Res, 2011, 1391: 93-101.
- [2] Shi LL, Chen BN, Gao M, et al. The characteristics of therapeutic effect of pinocembrin in transient global brain ischemia/reperfusion rats[J]. Life Sci, 2011, 88(11-12): 521-528.
- [3] Gao M, Zhu SY, Tan CB, et al. Pinocembrin protects the neurovascular unit by reducing inflammation and extracellular proteolysis in MCAO rats[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(5): 407-418.
- [4] Gao M, Zhang WC, Liu QS, et al. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 591(1-3): 73-79.
- [5] Gardana C, Simonetti P, Berti C et al. Evaluation of propolis polyphenols absorption in humans by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(23): 3849-3854.
- [6] 孙韬华, 严蓓, 曹国颖, 等. LC-MS/MS 法测定人粪便中匹诺塞林的浓度及在粪便排泄中的应用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(10): 773-775.
- [7] 倪玉材. 测量不确定度评定与表示指南 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2011: 108-123.
- [8] 严蓓, 杨晨, 李扬, 等. HPLC 法测定人血浆中奥硝唑浓度的不确定度评定 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(9): 1797-1803.