

UHPLC – MS/MS 法测定人血浆中 10,11 – 二氢 – 10 – 羟基卡马西平浓度的不确定度评定

Uncertainty evaluation for the determination of 10,11 – dihydro – 10 – hydroxycarbapazine in human plasma by UHPLC – MS/MS

李 伟¹, 潘学强¹, 赵志刚²,
梅升辉²

(1. 北京卫生职业学院 药学系, 北京 101101; 2. 首都医科大学 附属北京天坛医院 药学部, 北京 100070)

LI Wei¹, PAN Xue – qiang¹,
ZHAO Zhi – gang²,
MEI Sheng – hui²

(1. Department of Pharmacy, Beijing Health Vocational College, Beijing 101101, China; 2. Department of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China)

基金项目: 2022 年北京市职业教育教学改革基金资助项目(JG2022004)

作者简介: 李伟(1986 –)女, 副教授, 主要从事药物分析的相关研究

通信作者: 梅升辉, 主任药师

MP: 18810644939

E – mail: meishenghui1983@126.com

摘要:目的 评定超高效液相色谱 – 串联质谱法(UHPLC – MS/MS)测定人血浆中 10,11 – 二氢 – 10 – 羟基卡马西平(MHD)浓度的不确定度。方法 采用同位素内标, 流动相为含 0.1% 甲酸的甲醇和含 5% 甲醇与 0.1% 甲酸的水溶液, BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50.0 mm, 1.7 μm), 在 0.4 mL · min⁻¹ 流速下进行梯度洗脱, 3 分钟内实现分离。利用电喷雾电离(ESI), 在多反应监测(MRM)模式下, 使用 UHPLC – MS/MS 分析测定血浆样品浓度。考察该方法的专属性、标准曲线和定量下限、精密度、回收率、基质效应、稳定性。对 MHD 浓度测定过程中的各影响因素进行分析评定, 计算各因素的不确定度和合成不确定度, 最终计算扩展不确定度。结果 MHD 在 0.03 至 6.00 mg · L⁻¹ 范围内具有良好线性, 批内、批间样品检测的准确度与理论浓度的偏差在 ±15% 以内, 精密度变异系数均在 13.32% 以内。血浆样品 25 °C 下放置 9 h, 4 °C 下放置 5 h, 3 次冻融循环, -80 °C 下储存 18 d 等条件下均表现出良好的稳定性。根据各因素的不确定度计算结果, 低浓度质控的重复性、基质效应和回收率的不确定度较大, 分别为 1.96 × 10⁻², 5.49 × 10⁻² 和 7.25 × 10⁻²; 高浓度质控的基质效应和回收率不确定度较大, 分别为 4.92 × 10⁻² 和 2.01 × 10⁻²。人血浆中 MHD 低浓度(0.09 mg · L⁻¹)和高浓度(4.50 mg · L⁻¹)的扩展不确定度分别为 1.62 × 10⁻² mg · L⁻¹ 和 0.48 mg · L⁻¹ (P = 95%, k = 2)。结论 UHPLC – MS/MS 法测定人血浆中 MHD 浓度的不确定度在低浓度时主要由重复性、基质效应和回收率引入, 高浓度时主要由基质效应与回收率引入。

关键词: 10,11 – 二氢 – 10 – 羟基卡马西平; 超高效液相色谱 – 串联质谱法; 人血浆; 不确定度

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.23.010

中图分类号: R917 文献标志码: A

文章编号: 1001 – 6821(2025)23 – 3366 – 08

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty for the determination of 10,11 – dihydro – 10 – hydroxycarbapazine (MHD) in human plasma by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC – MS/MS). **Methods** An isotope – labeled internal standard was employed. Chromatographic separation was achieved within 3 min on a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50.0 mm, 1.7 μm) using a gradient elution at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹, with a mobile phase consisting of methanol containing 0.1% formic acid and water containing 5% methanol plus 0.1% formic acid. Plasma sample concentrations were determined by UHPLC – MS/MS with electrospray ionization (ESI) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method was validated

for selectivity, calibration curve, lower limit of quantification, precision, recovery, matrix effect, and stability. The influencing factors in the quantification of MHD were analyzed and evaluated to calculate the individual uncertainties, combined uncertainty, and finally the expanded uncertainty. **Results** MHD demonstrated good linearity within the range of 0.03 to 6.00 mg · L⁻¹. The accuracy (bias from the theoretical concentration) for within-run and between-run analyses was within ±15%, and the precision (coefficient of variation) was within 13.32%. Plasma samples showed good stability under the following conditions: 9 hours at 25 °C, 5 hours at 4 °C, three freeze-thaw cycles, and storage at -80 °C for 18 days. Based on the calculated uncertainty values for each contributing factor, repeatability, matrix effect, and recovery represented the major sources of uncertainty for the low-concentration quality control (QC) sample, with values of 1.96×10^{-2} , 5.49×10^{-2} , and 7.25×10^{-2} , respectively. For the high-concentration QC sample, matrix effect and recovery contributed substantially to the overall uncertainty, with values of 4.92×10^{-2} and 2.01×10^{-2} , respectively. The expanded uncertainties ($P = 95\%$, $k = 2$) for MHD at low (0.09 mg · L⁻¹) and high (4.50 mg · L⁻¹) concentrations in human plasma were 1.62×10^2 mg · L⁻¹ and 0.48 mg · L⁻¹, respectively. **Conclusion** The measurement uncertainty of MHD concentration in human plasma determined by UHPLC-MS/MS is primarily contributed by repeatability, matrix effect and recovery at low concentration levels, while dominated by matrix effect and recovery at high concentrations.

Key words: 10,11-dihydro-10-hydroxycarbazepine; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; human plasma; uncertainty

癫痫作为儿童群体高发的神经系统疾病,药物治疗仍是当前首选方案^[1-2]。奥卡西平因其疗效显著且安全性较好,被广泛应用于儿童癫痫治疗^[3-4],其活性成分为代谢物 10,11-二氢-10-羟基卡马西平,但血药浓度存在明显的个体差异^[5]。临床实践表明,该药物在儿童患者中易引发多种不良反应^[5-7]。通过监测 10,11-二氢-10-羟基卡马西平,开展治疗药物监测有助于设计个体化给药方案,确保血药浓度处于治疗窗内,从而优化疾病管理^[8]。

本团队前期已建立人血浆中 10,11-二氢-10-羟基卡马西平(10,11-dihydro-10-hydroxycarbazepine, MHD)的快速、灵敏定量分析方法^[9]。目前,针对此特定方法的测量不确定度研究尚缺乏报道,为进一步提升检测质量可靠性,本研究依据相关技术指南^[10],对该测定方法进行不确定度评估,量化了关键影响因素,以促进该方法的规范应用。

材料与方法

1 材料

空白血浆 来自北京天坛医院血库的匿名健康献血者残留样本。本研究经首都医科大学附属北京天坛医院医学伦理委员会批准,伦理批号:KY2022-018-02。

试剂 MHD 对照品,规格:每瓶 100 mg,纯度:97%,批号:20140827,中国南京康满林化工实业有限

公司生产;内标物(internal standard, IS)MHD-D4,规格:每瓶 1 mg,纯度:99.8%,批号:2-TMH-153-5,加拿大 Toronto Research Chemicals 公司生产;色谱级甲酸,规格:每瓶 50 mL,批号:225503,美国 Fisher 公司生产;色谱级甲醇,规格:每瓶 4 L,批号:203398,美国 Fisher 公司生产。

仪器 AB Qtrap 5500 质谱仪,美国 AB Sciex 产品;Waters Acquity UHPLC 超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司产品;SCILOGEX D2012 高速离心机,美国 SCILOGEX 公司产品;Mettler XS 105 DU 电子天平,瑞士 Mettler 公司产品;Millipore Direct-Q 3 纯水器,美国 Millipore 公司产品。

2 测定方法、标准溶液配制与血浆样品处理

色谱条件 采用 BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50.0 mm, 1.7 μm);流动相 A:含 0.1% 甲酸的甲醇, B:含 5% 甲醇与 0.1% 甲酸的水溶液;流速 0.4 mL · min⁻¹;柱温 37 °C;进样量 1 μL;自动进样器温度 10 °C。梯度洗脱程序:0 min (5.5% A)→1.0 min (80.0% A)→1.1 min (90.0% A)→1.6 min (90.0% A)→1.7 min (5.5% A)→3.0 min (5.5% A)^[9]。

质谱条件 电喷雾电离正离子模式(electrospray ionization positive ion mode, ESI⁺);监测离子对 m/z 255.1 > 194.1 和 255.1 > 237.1(MHD); m/z 259.1 > 198.1 和 259.1 > 241.1(IS);碰撞电压 28 V(MHD)/29 V(IS);去簇电压 50 V(MHD)/80 V(IS);入口电压 8 V(MHD)/8 V(IS);出口电压 18 V(MHD)/16 V(IS)^[9]。

溶液配制 标准工作液:精密称取 MHD 3.09 mg, 甲醇定容至 5 mL 得 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液。梯度稀释获得 0.30、0.60、3.00、6.00、30.00、60.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列工作液(S1-S6)及质控溶液(低浓度质控溶液: $0.90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 高浓度质控溶液: $45.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。内标工作液:精密称取 MHD-D4, 甲醇定容至 10 mL 得 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液, 稀释制得 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 工作液。

血浆样品处理 取 100 μL 空白血浆, 加入 10 μL 系列工作液及 10 μL 内标液, 添加 300 μL 甲醇涡旋混匀 30 s。4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 15 min 后, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 min。取上清液 20 μL 与 180 μL 甲醇混合, 涡旋 4 min 后同条件离心, 取上清进样。

3 方法学考察

3.1 专属性

分别取空白血浆(不含 MHD 及内标)、只加内标未加待测物的空白血浆、MHD 定量下限标准含药血浆样品、患者血浆样品, 按“血浆样品处理”项处理后检测。

3.2 标准曲线与定量下限

在 100 μL 空白血浆中用移液器加入 10 μL MHD 标准工作液, 10 μL 内标工作液, 配制血浆标准曲线样品, 各血浆样品中 MHD 质量浓度分别为 0.03、0.06、0.30、0.60、3.00 和 6.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 处理步骤按照“血浆样品处理”, 通过液质联用仪分析, 基于标准曲线 6 个浓度样品中 MHD 与内标的峰面积比定量, 对理论浓度与响应值(MHD 与内标峰面积比值)进行线性回归, 权重因子为 $1/x^2$, 定量下限为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.3 精密度

取不同浓度的质控样品(MHD 质量浓度分别为 0.03、0.09、 2.25×10^{-1} 、2.25、4.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。进行测定(分析批数量为 7, 每批包含 5 个浓度水平的质控, 每个浓度平行配制 5 份), 通过标准曲线计算测定浓度, 评估批内和批间准确度和精密度。

3.4 基质效应与回收率

回收率和基质效应通过制备不同质控浓度水平(MHD 质量浓度分别为 0.09、 2.25×10^{-1} 、2.25、4.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 3 批样品进行评估, 3 批样品如下: (A) 取 6 名不同个体的空白血浆 100 μL , 加入分析物 10 μL 及内标 10 μL 后进行提取; (B) 取 6 名不同个体的空白血浆提取后的 100 μL , 加入分析物 10 μL 及内标 10 μL (即提取后空白血浆); (C) 将分析物 10 μL 及内标 10 μL 溶于 100 μL 水, 按“血浆样品处理”项处理后检测。回收率 = $(A/B \times 100)\%$, 基质

效应 = $(B/C \times 100)\%$ 。内标归一化的回收率与基质因子分别为 $(A_{\text{分析物}}/B_{\text{分析物}})/(A_{\text{内标}}/B_{\text{内标}}) \times 100\%$ 和 $(B_{\text{分析物}}/C_{\text{分析物}})/(B_{\text{内标}}/C_{\text{内标}}) \times 100\%$ 。

3.5 稳定性

通过制备 4 个浓度水平的质控样品(MHD 质量浓度分别为 0.09、 2.25×10^{-1} 、2.25、4.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 在下列特定条件下进行稳定性评估:

血浆样品: 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 3、5、9 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 5 h; -80 $^{\circ}\text{C}$ 至 25 $^{\circ}\text{C}$ 间经 3 次冻融循环; -80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 18 d。

提取后样品: 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 4、8 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 8 h; 10 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 10 h; -80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存 12 d。

稳定性通过计算储存后样品测定值与初始值的偏差进行评估(血浆样品的初始值为同日制备的 QC 样品浓度; 提取后样品的初始值为制备后立即测定的浓度)。若偏差在 $\pm 15\%$ 以内, 则认为分析物在该条件下稳定。

3.6 残留效应

在最高浓度校准样品进样后立即进样空白样品, 以评估待测物及内标(IS)的进样残留。若空白样品中待测物与内标的色谱响应分别低于定量下限(LLOQ)样品中相应响应的 20% 和 5%, 则认为残留效应在可接受范围内。

4 数学模型

标准曲线方程: $y = ax + b$

浓度计算公式: $C = x \times f$

(x : MHD 浓度; y : MHD 与内标峰面积比; a : 斜率; b : 截距; f : 温度校正因子, 由于不同时间、季节实验室内温度可能出现较大变化, 通过温度校正因子, 消除因季节或空调波动带来的潜在系统偏差)

结 果

1 方法学评价

1.1 专属性

MHD 和同位素内标的保留时间为 1.84 min 左右, 空白人血浆中的信号响应远低于 LLOQ 中待测物及 IS 响应的 5%, 表明方法的选择性符合要求。在仅含内标的样品中, 待测物的响应远低于其在 LLOQ 样品中响应的 5%, 见图 1。

1.2 标准曲线与定量下限

MHD 在 0.03 至 6.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内呈现良好的线性关系, 且相关系数较高。典型的线性回归方程如下: $y = 4.45x + 1.56$, $r = 0.9970$ (其中 x 为待

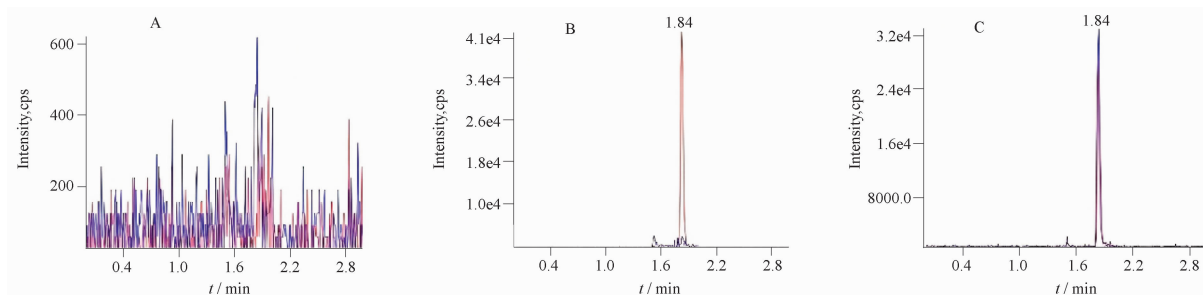


图 1 10,11-二氢-10-羟基卡马西平 (MHD) 及内标 (MHD-D4) 的典型谱图

Figure 1 Typical spectrum of 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazepine (MHD) and internal standard (MHD-D4) obtained from: (A) blank plasma; (B) blank plasma spiked with internal standard (MHD-D4) but not analytes; (C) blank plasma spiked with lower limit of quantitation ($0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for MHD

测物浓度, y 为待测物与内标的峰面积比)。定量下限为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 精密度

方法的批内及批间准确度与精密度对所有待测物均符合要求。在 5 个质控浓度水平下, MHD 的批内及批间偏差为 -13.11% 至 -0.97% ; 变异系数均 $<13.32\%$ 。

1.4 基质效应与回收率

MHD 的回收率和基质效应均值分别为 97.25% 至 128.59% 与 76.41% 至 89.38% 。经同位素内标校正后, 内标归一化提取效率与基质效应分别为 93.02% 至 99.75% 与 97.30% 至 104.53% (变异系数 $<13.46\%$)。

1.5 稳定性

MHD 生物基质样品在以下条件下均稳定: 血浆样品 25°C 下放置 9 h; 4°C 下放置 5 h; -80°C 至 25°C 间经 3 次冻融循环; -80°C 下储存 18 d。提取后样品: 25°C 下放置 8 h; 4°C 下放置 8 h; 10°C 下放置 10 h; -80°C 下储存 12 d。各浓度测定结果均值相对误差均在 $\pm 15\%$ 范围内。

1.6 残留效应

空白血浆样品的分析结果显示, 待测物 MHD 及内标 (IS) 的残留效应可忽略不计。

2 不确定度分析

2.1 不确定度来源

实验流程分析表明, 不确定度主要源于: 对照品纯度、称量误差、温度波动、溶液配制、生物样本处理、仪器精密度、重复性、回收率、基质效应及标准曲线拟合。下文将逐项评估低浓度 (L, $0.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高浓度 (H, $4.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的各项不确定度分量。

2.2 不确定度分量量化

2.2.1 对照品纯度

纯度 $Pr = 97\%$, 假设误差 $\alpha = 0.25\%$ (均匀分布

$k = \sqrt{3}$)^[11], 相对不确定度 $u_r(1, L) = u_r(1, H) = \frac{\alpha}{k \times P_r} = 1.45 \times 10^{-3}$ 。样品均匀性影响可忽略。

2.2.2 称量误差

电子天平 ($e = 0.01 \text{ mg}$), 非线性误差 $u(\Delta)$ 及调零误差 $u(\Delta_0)$ 服从均匀分布 ($k = \sqrt{3}$): $u(\Delta) = \frac{a}{k} = 0.5e/\sqrt{3} = 2.89 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。减重称量时: 自动调零作为一次扣皮, 则 $a_0 = a$, $u(\Delta_0) = u(\Delta)$

重复性误差 $u(m)$ 会计入重复性实验中, 在此不重复计算。

$$u_c(m) = \sqrt{u^2(m) + u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = \sqrt{u^2(\Delta_0) + u^2(\Delta)} = 4.09 \times 10^{-3} \text{ mg}$$

MHD 称量值 W 为 3.09 mg , 相对不确定度 $u_r(2) = u_r(W) = \frac{u_c(m)}{w} = 0.00409/3.09 = 1.32 \times 10^{-3}$ 。

2.2.3 温度效应

甲醇膨胀系数 $\alpha = 1.19 \times 10^{-3} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, 玻璃器皿膨胀系数 $7.54 \times 10^{-6} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ^[12]。实验室温度波动 ΔT 为 $\pm 2^\circ\text{C}$ (矩形分布, $k = \sqrt{3}$):

$$u_r(\text{温度}) = \sqrt{\left(\frac{\alpha \times V \times \Delta T}{V \times \sqrt{3}}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{(1.19 \times 10^{-3} - 7.535 \times 10^{-6}) \times 2}{\sqrt{3}}\right)^2} = 1.37 \times 10^{-3}$$

(α 为膨胀系数差) 该分量并入容器允差评估。

2.2.4 溶液配制

容量瓶: 5 mL 、 10 mL A 级容量瓶允差 $\pm 0.010 \text{ mL}$ 和 $\pm 0.020 \text{ mL}$ (三角分布 $k = \sqrt{6}$, $\bar{x}$ 为量器量程, a 为量器允差):

$$u_r(\text{允差}, F_{10 \text{ mL}}) = a/(kx^-)$$

$$u_r(F_{5 \text{ mL}}) = u_r(F_{10 \text{ mL}}) = \sqrt{0.000817^2 + 0.00137^2} =$$

1.59×10^{-3}

移液管:1 mL、2 mL、5 mL A 级移液管允差 $\pm 8.00 \times 10^{-3}$ mL、 $\pm 1.20 \times 10^{-2}$ mL 和 $\pm 2.50 \times 10^{-2}$ mL, 对

应的 $u_r(P_{1\text{ mL}}) = 3.54 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{2\text{ mL}}) = 2.81 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{5\text{ mL}}) = 2.46 \times 10^{-3}$ 。
工作液合成不确定度为:

$$u_r(\text{Prep, std}) = \sqrt{u_r^2(F_{5\text{ mL}}) + 6u_r^2(F_{10\text{ mL}}) + u_r^2(P_{1\text{ mL}}) + 2u_r^2(P_{2\text{ mL}}) + 3u_r^2(P_{5\text{ mL}})} = 8.01 \times 10^{-3}$$

$$u_r(\text{Prep, L}) = \sqrt{u_r^2(F_{5\text{ mL}}) + 3u_r^2(F_{10\text{ mL}}) + 2u_r^2(P_{1\text{ mL}}) + u_r^2(P_{2\text{ mL}})} = 6.57 \times 10^{-3}$$

$$u_r(\text{Prep, H}) = \sqrt{u_r^2(F_{5\text{ mL}}) + u_r^2(F_{10\text{ mL}}) + u_r^2(P_{1\text{ mL}})} = 4.20 \times 10^{-3}$$

$$u_r(3, QC) = \sqrt{u_r^2(\text{Prep, std}) + u_r^2(\text{Prep, QC})}$$

$$u_r(3, L) = 1.04 \times 10^{-2}, u_r(3, H) = 9.05 \times 10^{-3}$$

2.2.5 生物样本处理

移液器允差(三角分布 $k=\sqrt{6}$, $\bar{x}$ 为量程, a 为允差):

2 ~ 20 μL (P_1): (10 μL : $\pm 1.2\%$, $u_r(P_{1-10}) = 5.09 \times 10^{-3}$; 20 μL : $\pm 1.0\%$, $u_r(P_{1-20}) = 4.31 \times 10^{-3}$)

10 ~ 100 μL (100 μL : $\pm 0.6\%$, $u_r(P_{2-100}) = 2.81 \times 10^{-3}$)

20 ~ 200 μL (180 μL : $\pm 1.0\%$, $u_r(P_{3-180}) = 4.31 \times 10^{-3}$)

100 ~ 1000 μL (300 μL : $\pm 1.0\%$, $u_r(P_{4-300}) = 4.31 \times 10^{-3}$)

$$u_r(4, S) = u_r(4, QC) = \sqrt{2u_r^2(P_{1-10}) + u_r^2(P_{1-20}) + u_r^2(P_{2-100}) + u_r^2(P_{3-180}) + u_r^2(P_{4-300})} = 1.07 \times 10^{-2}$$

$$u_r(4, L) = u_r(4, H) = \sqrt{u_r^2(4, S) + u_r^2(4, QC)} = 1.52 \times 10^{-2}$$

2.2.6 仪器精密度

质谱/液相定量允差 $\pm 1\%$ (均匀分布 $k=\sqrt{3}$):

$$u_r(5, L) = u_r(5, H) = \sqrt{u_r^2(MS) + u_r^2(LC)} = \sqrt{\left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{0.01}{\sqrt{3}}\right)^2} = 8.16 \times 10^{-3}$$

2.2.7 重复性

质控样品(L:0.09 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; H:4.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)7 组平行测定($m=7$), 每组测定 5 次($n=5$), 数据见表 1:

移液器引入的相对标准测量不确定度分别为:

$u_r(P_{1-10}) = 5.09 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{1-20}) = 4.31 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{2-100}) = 2.81 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{3-180}) = 4.31 \times 10^{-3}$, $u_r(P_{4-300}) = 4.31 \times 10^{-3}$ 。

样品配制合成不确定度:标准含药样品(S)和质控样品(QC)配制分别使用:2 ~ 20 μL 吸取 10 μL 2 次, 吸取 20 μL 1 次, 10 ~ 100 μL 吸取 100 μL 1 次, 20 ~ 200 μL 吸取 180 μL 1 次, 100 ~ 1000 μL 吸取 300 μL 1 次, 则配制样品时的相对标准测量不确定度为:

贝塞尔公式计算合并样本偏差 $S_p(\bar{x}, QC) = S_p(x, QC) / \sqrt{mn}$ 。

$S_p(x, L) = 9.91 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $S_p(x, H) = 4.07 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

相对不确定度: $u_r(x, QC) = S_p(x, QC) / \bar{x}_{QC}, \bar{x}_L = 8.53 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x}_H = 4.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

$u_r(6, L) = u_r(x, L) = 1.96 \times 10^{-2}$, $u_r(6, H) = u_r(x, H) = 1.69 \times 10^{-2}$

表 1 样品重复测定数据($n=5$)

Table 1 The repeatability for sample determination ($n=5$)

Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
0.09	-9.89×10^{-2}	-8.07×10^{-2}	8.74×10^{-2}	8.01×10^{-2}	9.07×10^{-2}	8.53×10^{-2}	8.11×10^{-2}
	9.28×10^{-2}	7.27×10^{-2}	8.14×10^{-2}	8.15×10^{-2}	8.42×10^{-2}	9.02×10^{-2}	9.05×10^{-2}
	7.36×10^{-2}	7.31×10^{-2}	7.94×10^{-2}	8.65×10^{-2}	7.48×10^{-2}	9.81×10^{-2}	8.76×10^{-2}
	9.81×10^{-2}	8.09×10^{-2}	1.03×10^{-1}	9.79×10^{-2}	7.60×10^{-2}	8.51×10^{-2}	7.83×10^{-2}
	8.58×10^{-2}	7.87×10^{-2}	1.04×10^{-1}	7.20×10^{-2}	8.06×10^{-2}	9.70×10^{-2}	7.84×10^{-2}
4.50	3.96	4.28	4.4	4.06	4.38	4.11	3.80
	3.94	3.82	3.98	4.27	4.05	3.45	4.39
	4.41	3.91	4.53	3.75	3.81	3.48	4.67
	3.89	3.50	4.95	4.22	3.79	4.18	4.07
	3.76	3.75	4.47	4.78	3.52	3.86	4.16

2.2.8 回收率与基质效应

用 MHD 的回收率(基质效应)除以 IS 的回收率(基质效应)得内标归一化的回收率(基质效应)。平行测 6 次($n=6$),内标归一化回收率 $RE \pm SD$: L: $(97.87 \pm 17.37)\%$, H: $(95.92 \pm 4.72)\%$, $u_r(7, QC) = u_r(RE, QC) = SD_{QC}/(RE\%_{QC} \times \sqrt{n})$, $u_r(7, L) = 7.25 \times 10^{-2}$, $u_r(7, H) = 2.01 \times 10^{-2}$ 。

内标归一化基质效应 $ME \pm SD$: L:

$(98.47 \pm 13.25)\%$, H: $(104.35 \pm 12.57)\%$

$$u_r(8, QC) = u_r(ME, QC) = SD_{QC}/(ME\%_{QC} \times \sqrt{n})$$

$$u_r(8, L) = 5.49 \times 10^{-2}, u_r(8, H) = 4.92 \times 10^{-2}。$$

2.2.9 标准曲线拟合

用 MHD 峰面积与内标峰面积的比值对浓度进行线性拟合,加权回归($1/x^2$),峰面积比及回归曲线参数见表 2。用拟合曲线反算对照品血浆中 MHD 浓度,反算浓度见表 3。

表 2 10,11-二氢-10-羟基卡马西平与内标峰面积比及回归曲线参数

Table 2 Area ratio of 10,11-dihydro-10-hydroxycarbapazine to the internal standard and parameters of the calibration curves

Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Calibration curve 1 (CC 1)	Calibration curve 2 (CC 2)	Calibration curve 3 (CC 3)	Calibration curve - 4 (CC 4)	Calibration curve - 5 (CC 5)	Calibration curve - 6 (CC 6)	Calibration curve - 7 (CC 7)	Mean
0.03	1.28	1.84	1.43	1.56	1.60	1.28	1.49	
0.06	2.37	3.34	2.79	3.27	2.92	2.47	2.66	
0.30	10.65	14.16	11.23	13.11	14.31	12.44	13.13	
0.60	24.76	31.27	20.74	31.45	28.76	26.91	27.64	
3.00	97.67	134.87	112.38	146.31	154.47	135.76	121.43	
6.00	209.13	253.81	229.03	280.34	263.04	263.52	256.93	
Slope	35.70	46.20	36.90	48.20	47.40	43.80	42.80	43.00
Intercept	0.21	0.48	0.37	0.15	0.15	-0.07	0.18	0.21

表 3 用拟合曲线计算出每个校正曲线样品 10,11-二氢-10-羟基卡马西平浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Table 3 Back-calculated concentrations of 10,11-dihydro-10-hydroxycarbapazine in standard plasma samples ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

Concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Calibration curve 1 (CC 1)	Calibration curve 2 (CC 2)	Calibration curve 3 (CC 3)	Calibration curve 4 (CC 4)	Calibration curve 5 (CC 5)	Calibration curve 6 (CC 6)	Calibration curve 7 (CC 7)
0.03	2.99×10^{-2}	2.93×10^{-2}	2.88×10^{-2}	2.91×10^{-2}	3.05×10^{-2}	3.07×10^{-2}	3.05×10^{-2}
0.06	6.04×10^{-2}	6.19×10^{-2}	6.56×10^{-2}	6.46×10^{-2}	5.85×10^{-2}	5.79×10^{-2}	5.80×10^{-2}
0.30	2.92×10^{-1}	2.96×10^{-1}	2.94×10^{-1}	2.69×10^{-1}	2.99×10^{-1}	2.86×10^{-1}	3.03×10^{-1}
0.60	6.88×10^{-1}	6.66×10^{-1}	5.52×10^{-1}	6.49×10^{-1}	6.04×10^{-1}	6.16×10^{-1}	6.42×10^{-1}
3.00	2.73	2.91	3.04	3.03	3.26	3.10	2.83
6.00	5.85	5.48	6.20	5.81	5.55	6.02	6.00

标准曲线 6 个浓度($n=6$),每个浓度测定 7 次($m=7$), $N=mn=42$, a_m 为标曲斜率; b_m 为标曲截距; x_i 为第 i 个标准血浆溶液的浓度, $\bar{x}$ 为 6 个标准血浆浓度的理论平均值, i 为每组对照溶液的序数, j 为测定血浆标准溶液的序数。

残余标准差

$$S = \sqrt{\sum_{j=1}^{mn} [y_j - (a_m x_j + b_m)]^2 / (N-2)} = 1.28 \times 10^{-3},$$

$$\text{自相关方差为: } S_{xx} = \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})^2 = 192.47$$

测定低、高浓度质控样品各 35 次($P=35$),平均

斜率 $\bar{a} = 43.00$, 平均浓度 $\bar{x}_L = 8.53 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\bar{x}_H = 4.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

曲线拟合不确定度:

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

$$u(x_L) = 7.59 \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}, u(x_H) = 8.53 \times 10^{-6} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

曲线拟合的相对标准测量不确定度为:

$$u_r(10, L) = u_r(x_L) = u(x_L) / \bar{x}_L = 0.00000759 / 0.090 = 9.00 \times 10^{-5}$$

$$u_r(10, H) = u_r(x_H) = u(x_H)/\bar{x}_H = 0.00000853/$$

$$4.20 = 2.10 \times 10^{-6}$$

2.3 合成不确定度

$$u_{r,c} = \sqrt{u_r^2(1) + u_r^2(2) + u_r^2(3) + u_r^2(4) + u_r^2(5) + u_r^2(6) + u_r^2(7) + u_r^2(8) + u_r^2(9)}$$

则 MHD 质控样品的合成相对标准测量不确定度分别为:

$$u_{r,c}(L) = 9.52 \times 10^{-2}, u_{r,c}(H) = 5.91 \times 10^{-2}.$$

MHD 质控样品的合成标准测量不确定度分别为:

$$u_c(L) = u_{r,c}(L) \times \bar{x}_L = 0.085 \times 0.0952 = 8.09 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$u_c(H) = u_{r,c}(H) \times \bar{x}_H = 4.07 \times 0.0591 = 0.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

各不确定度分量直方图见图 1。

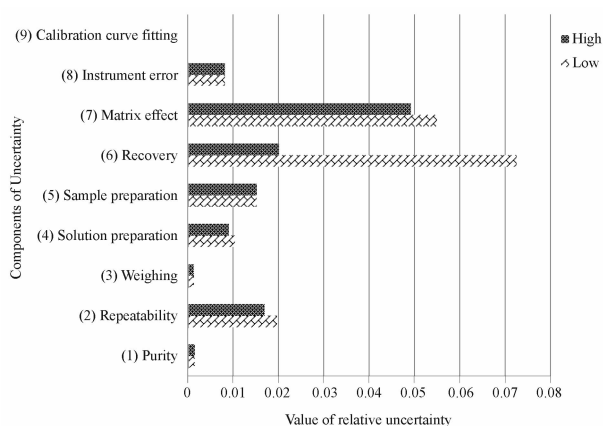


图2 超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法测定人血浆中MHD浓度的不确定度分量图

Figure 2 Histogram of the uncertainty components in the determination of MHD in human plasma by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UHPLC – MS/MS)

2.4 扩展不确定度

置信水平 95% ($k=2$), 扩展不确定度分别为:

$$U_L = k \times u_c(L) = 1.62 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}, U_H = k \times u_c(H) = 0.48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$$

测定结果分别表示为: $(8.50 \times 10^{-2} \pm 1.62 \times 10^{-2}) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}(L)$, $(4.07 \pm 0.48) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}(H)$

讨 论

不确定度分量直方图(图1)显示,基质效应与回收率对高/低浓度均产生显著影响^[13-16],是总不确定度的主要贡献者,这与文献结论一致。实验中已采用内标法对回收率进行校正,为进一步降低该

因素引入的变异性,后续研究可聚焦于优化蛋白沉淀试剂的选择或探索其他样本预处理方法。基质效应主要源于样本中共存组分在电喷雾离子化过程中对目标物离子化效率的干扰,其程度受样本基质复杂性、前处理方法、色谱分离条件及分离效能等多种因素影响。为降低由此产生的不确定度,需对生物样本前处理流程进行系统优化,以最大程度减少最终进样液中的基质成分。例如,采用固相萃取技术替代有机溶剂沉淀法通常可显著减弱基质效应,但该技术成本较高,且往往难以满足临床检测对高通量与快速性的要求。此外,优化色谱条件以延长分析物保留时间也是降低基质效应的有效途径。采用同位素内标也可有效抑制基质效应^[17],但成本较高,限制了其常规应用。重复性测定引入的不确定度同样不可忽视,尤其是在低浓度时更为显著^[18-19],此项不确定度主要由前处理操作的准确性、仪器稳定性及响应值的变化,这提示需严格规范操作流程以保证测定精度,同时优化定量下限可提升低浓度检测准确性^[14]。

一个尤其需要注意的因素是温度效应,虽然本次未在单项中列出,但温度波动可能影响工作溶液的稳定性,移液器的精度,容器的膨胀效应,温度带来的不确定度约占容器总不确定度的80%,不可忽视,这提示在溶液配制、样品制备等关键步骤中控制环境温度的重要性。称量误差因本实验使用天平精度高而可忽略^[20],若使用低精度天平,则需通过增加称样量以降低称量误差。本方法中的曲线拟合带来的影响非常小,这可能与权重因子优化及同位素内标的使用有关。

综上,本方法不确定度在低浓度时主要由重复性、基质效应和回收率主导,高浓度时主要受基质效应与回收率支配。

参考文献:

- [1] GOGOU M, CROSS J H. Seizures and epilepsy in childhood. *Continuum (Minneapolis)*, 2022, 28(2): 428–456.
- [2] 林雅男. 丙戊酸钠和奥卡西平对癫痫儿童生长速度和骨代谢的潜在影响[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(9): 150–151.
- [3] DORING J H, SAFFARI A, BAST T, *et al.* Efficacy, tolerability, and retention of antiseizure medications in PRRT2 – associated infantile Epilepsy[J/OL]. *Neurol Genet*, 2022, 8(5): e200020. 2022 – 09 – 28 [2025 – 07 – 03]. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9520344/>
- [4] HAKANSSON S, WICKSTROM R, ZELANO J. Selection and continuation of antiseizure medication in children with epilepsy in Sweden from 2007 to 2020[J/OL]. *Pediatr Neurol*, 2023, 144:

- 19—25. 2023 - 03 - 30 [2025 - 07 - 03]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887-8994\(23\)00096-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887-8994(23)00096-6)
- [5] ZHOU S, LI R, CHEN Z, *et al.* LC - MS/MS quantification of levetiracetam, lamotrigine and 10 - hydroxycarbapazine in TDM of epileptic patients [J/OL]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36 (8); e5393. 2022 - 05 - 8 [2025 - 07 - 03]. <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.5393>
- [6] MA Y, DENG J, FU Z, *et al.* Efficacy and tolerability of oxcarbazepine in the treatment of focal epilepsy in neonates and infants under 3 months of age: A single - center retrospective analysis [J/OL]. *Epilepsy Res*, 2023, 197: 107240. 2023 - 10 - 12 [2025 - 07 - 03]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920121123001651?via%3Dihub>
- [7] 姚国囡,周宇,付文倩,等. HPLC 法测定人血浆中奥卡西平活性代谢产物单羟基卡马西平的浓度 [J]. 药学实践杂志, 2021, 39 (1): 53—57.
- [8] 刘东平,谢海燕. RP - HPLC 法测定血浆中奥卡西平及其活性代谢物浓度 [J]. 广东化工, 2021, 48 (10): 231—233.
- [9] ZHAO Q, JIN S Y, LIU Q Y, *et al.* Simultaneous determination of lamotrigine, topiramate, oxcarbazepine, and 10, 11 - dihydro - 10 - hydroxycarbapazine in human blood plasma by UHPLC - MS/MS [J]. *Curr Anal Chem*, 2021, 16 (8): 1010—1021.
- [10] JJF - 1059. 1 - 2012, 测量不确定度评定与表示 [S]. 2012; 4—5
- [11] 朱静毅,房克慧. HPLC 法测定地塞米松磷酸钠注射液含量的不确定度分析. 药学与临床研究, 2008 (4): 258—261.
- [12] 肖晓芳,陈丽梅,程敏熙. 测量玻璃热膨胀系数和折射率温度系数实验. 实验室研究与探索, 2010, 29 (4): 24—26.
- [13] 李伟,梅升辉,郝晶晶,等. UHPLC - MS/MS 法测定人血浆中托吡酯浓度的不确定度评定 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (6): 700—705.
- [14] 莎日娜,张冬婕,赵志刚,等. UHPLC - MS/MS 测定人全血他克莫司浓度的不确定度评定 [J]. 中国药师, 2021, 24 (9): 1752—1757.
- [15] 曹仁智,咎莹,刘艳芳,等. LC - MS/MS 法测定人血浆中依托考昔浓度的不确定度评定 [J]. 药物评价研究, 2021, 44 (12): 2621—2626.
- [16] 张博,郝晶晶,赵志刚,等. 用 UPLC - MS/MS 法测定人血浆中拉氧头孢浓度的不确定度评定 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (18): 2689—2693.
- [17] 郝晶晶,李伟,梅升辉,等. 建立 UHPLC - MS/MS 法测定人血浆中舒巴坦钠浓度的不确定度的方法 [J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36 (10): 1360—1363, 1368.
- [18] 王佳庆,汪祺,刘彤彤,等. 超高效液相色谱质谱联用法测定人全血中他克莫司含量不确定度评定 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22 (4): 386—390.
- [19] 金绍明,宁霄. 超高效液相色谱质谱联用法测定大鼠血浆中氨溴索含量与不确定度评定 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22 (4): 381—385.
- [20] 黄婧. 高效液相色谱法测定头孢呋辛酯片含量的不确定度评定 [J]. 中国药品标准, 2021, 22 (6): 583—586.

(收稿日期 2025 - 07 - 03)

· 科学文摘 ·

一种治疗尼帕病毒感染的候选药物 VV116

引自:ZHANG Y, *et al.* The oral nucleoside drug VV116 is a promising candidate for treating Nipah virus infection [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2025, 14 (1): 2587983.

中国科学院武汉病毒研究所肖庚富、张磊研究员团队及单超研究员团队联合上海药物研究所、旺山旺水生物医药股份有限公司胡天文博士共同证实口服核苷类药物 VV116 对尼帕病毒 (Nipah virus) 具有显著的抗病毒活性。VV116 是一种靶向于病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA - dependent RNA polymerase, RdRp) 的前体药物,在体外实验中 VV116 及其代谢活性分子均展示了对尼帕病毒的显著抑制作用。在金黄地鼠致死剂量感染模型中,口服给于 400mg/kg 的 VV116 能将实验动物的存活率提高至 66.7%,并显著降低感染靶器官肺、脾和脑中的病毒载量。VV116 为这一高致死性新发传染病的防治带来了希望。