

- pharmacokinetics of asiatic acid in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2015, 32(3): 314-317.
- [5] GRIMALDI R, DE PONTI F, D'ANGELO L, et al. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administrations to healthy volunteers. A new assay for asiatic acid [J]. *J Ethnopharmacol*, 1990, 28(2): 235-241.
- [6] RAFAMANTANANA M H, ROZET E, RAOELISON G E, CHEUK K, et al. An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE) [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(23): 2396-2402.
- [7] NAIR S N, MENON S, SHAILAJAN S. liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for quantification of asiatic acid from plasma: application to pharmacokinetic study in rats [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2012, 26(17): 1899-1908.
- [8] CHASSAUD L F, FRY B J, HAWKINS D R, et al. The metabolism of asiatic acid, madecassic acid and asiaticoside in the rat [J]. *Arzneimittelforschung*, 1971, 21(9): 1379-1384.
- [9] ZHANG Y W, YIN L N, LIANG Z H, et al. Microstructure of asiatic acid lipid nanoparticles and its effect on intestinal absorption kinetics [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2014, 23(19): 2284-2290.
- [10] LENG D D, HAN W J, RUI Y, et al. *In vivo* disposition and metabolism of madecassoside, a major bioactive constituent in *Centella asiatica* (L.) Urb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(2): 601-608.
- [11] RODRÍGUEZ-ORTIGOSA C M, BANALES J M, OLIVAS I, et al. Biliary secretion of S-nitrosoglutathione is involved in the hyperchloresis induced by ursodeoxycholic acid in the normal rat [J]. *Hepatology*, 2010, 52(2): 667-677.
- [12] ZONG L, QU Y, LUO D X, et al. Preliminary experimental research on the mechanism of liver bile secretion stimulated by peppermint oil [J]. *J Dig Dis*, 2011, 12(4): 295-301.
- [13] ZHENG X C, WANG S H. Determination of asiatic acid in beagle dog plasma after oral administration of *Centella asiatica* extract by precolumn derivatization RP-HPLC [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, 877(5/6): 477-481.
- [14] WANG S H, YIN L N, LIANG Z H, et al. Stereoselective behavior of a novel biodegradable racemic ketoprofen injectable implant in rats [J]. *Chirality*, 2007, 19(10): 769-774.
- [15] YUAN H, CHEN J, DU Y Z, et al. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2007, 58(2): 157-164.
- [16] DOYLE-MCCULLOUGH M, SMYTH S H, MOYES S M, et al. Factors influencing intestinal microparticle uptake *in vivo* [J]. *Int J Pharm*, 2007, 335(1/2): 79-89.
- [17] LAI S K, WANG Y Y, HANES J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(2): 158-171.

收稿日期: 2015-10-25

## 离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量的测量不确定度评估

曹琳<sup>1</sup>, 钱江<sup>2</sup>(1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100)

**摘要:** 目的 对离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量的测量不确定度进行分析, 以找出影响不确定度的因素。方法 建立离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量的数学模型, 确定影响不确定度的因素, 并根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059.1-2012)中有关规定, 量化各不确定度分量, 计算合成不确定度从而得出测定结果的扩展不确定度。**结果** 测定结果的合成不确定度为 0.989%, 扩展不确定度为 1.98%, 注射用帕米膦酸二钠的含量为标示量的(99.29±1.98)%( $k=2$ )。**结论** 测定结果的不确定度主要来源于离子色谱仪器、测定的重复性以及对照品的影响。建立的不确定度评估方法适用于离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量的不确定度评估。

**关键词:** 离子色谱法; 注射用帕米膦酸二钠; 不确定度评估

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)04-0448-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.016

### Evaluation of Measurement Uncertainty for the Determination of Pamidronate Disodium for Injection by Ion Chromatography

CAO Lin<sup>1</sup>, QIAN Jiang<sup>2</sup>(1. Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To evaluate the measurement uncertainty for the determination of pamidronate disodium for injection by ion chromatography, and find out the effect factors. **METHODS** The mathematical model was established, and the uncertainty was appraised according to JJF1059.1-2012. The various measurement uncertainties were quantified, and the

作者简介: 曹琳, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0574)87834649 E-mail: portial104@139.com

evaluation results of measurement uncertainty were drawn. **RESULTS** The combined uncertainty was 0.989%, the expanded uncertainty was 1.98%, and the content of pamidronate disodium was (99.29±1.98)% ( $k=2$ ). **CONCLUSION** The uncertainty originates primarily from the stability of ion chromatography, the repeatability and the reference substance. This uncertainty evaluation method can be used for uncertainty analysis in the determination of pamidronate disodium for injection by ion chromatography.

**KEY WORDS:** ion chromatography; pamidronate disodium for injection; uncertainty analysis

随着人们对检验结果可靠性的要求不断提高, 测量不确定度在分析化学领域日益受到关注和重视, 也成为计量认证和实验室认可评审的重点内容之一。

帕米膦酸二钠是一种钙调节药, 适用于恶性肿瘤并发的高钙血症和溶骨性癌转移引起的骨痛, 其剂型有注射用帕米膦酸二钠及帕米膦酸二钠注射液, 质量标准均收载于中国药典 2010 年版二部<sup>[1]458-459</sup>, 含量测定采用离子色谱法。离子色谱法作为中国药典 2010 年版新增附录方法<sup>[1]附录 38-39</sup>, 二部中仅有 2 个品种即帕米膦酸二钠及氯膦酸二钠各论项下收载。本研究根据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059.1-2012)<sup>[2]</sup>中有关规定, 建立了注射用帕米膦酸二钠测量不确定度的评估方法, 分析影响不确定度的因素。计算出的标准不确定度为客观评价注射用帕米膦酸二钠的含量测定结果提供了科学依据; 并根据评估结果, 分析不确定度来源。

## 1 仪器与试剂

ICS 1100 离子色谱仪(戴安公司); R200 D 型电子天平(赛多利斯公司)。帕米膦酸二钠对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100976-200701, 含量: 99.6%); 草酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 注射用帕米膦酸二钠(某药品生产企业, 批号: 02150101, 规格: 15 mg)。

## 2 方法与结果

### 2.1 供试品溶液的制备

取样品 3 瓶, 分别加水 10 mL 并定量转移置于 100 mL 量瓶中, 加水分次洗涤容器, 洗液并入量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

### 2.2 对照品溶液的制备

称取帕米膦酸二钠对照品约 11.25 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

DIONEX Ion AS22 阴离子交换色谱柱(4 mm×250 mm); 柱温为 30 °C; 流动相为 3 mmol·L<sup>-1</sup> 草

酸溶液; 流速为 1.2 mL·min<sup>-1</sup>; 检测器为电导检测器; 进样体积为 25 μL。理论板数按帕米膦酸二钠峰计为 5 936, 符合不<2 000 的要求。

## 2.4 测量不确定度的评估<sup>[3-5]</sup>

**2.4.1 注射用帕米膦酸二钠含量的计算** 含量计算公式如下:

$$Y = \frac{A_{\text{样}} \times \bar{f}}{V_{\text{样}} \times 15} \times 100 \quad (1)$$

其中 
$$\bar{f} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{C_{ri}}{A_{ri}} \right) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{W_{ri} P_{ri}}{A_{ri} V_{ri}} \right) \quad (2)$$

式中,  $Y$  为试样中帕米膦酸二钠为标示量的含量(%),  $A_{\text{样}}$  为样品峰面积,  $\bar{f}$  为对照品校正因子,  $V_{\text{样}}$  为试样定容体积 100 mL,  $W_r$  为对照品的称样量(mg),  $P_r$  为对照品的纯度,  $A_r$  为对照品峰面积,  $V_r$  为对照品定容体积 25 mL,  $n$  为对照品溶液的测定次数, 15 为注射用帕米膦酸二钠的标示规格(mg)。

**2.4.2 数学模型的建立及不确定度的表示** 在实际评估中, 应该考虑含量测定过程中的各种随机影响。将各个随机影响合并考虑, 在上述计算公式中增加重复性系数  $f_{\text{rep}}$ , 其数值等于 1。评定不确定度的数学模型写成如下形式:

$$Y = \frac{A_{\text{样}} \times \bar{f}}{V_{\text{样}} \times 15} f_{\text{rep}} \times 100 \quad (3)$$

公式(3)中的 3 个变量彼此相互独立, 依据不确定度传播定律得到  $Y$  的相对合成标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(Y) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(f_{\text{rep}}) + u_{\text{rel}}^2(A) + u_{\text{rel}}^2(\bar{f}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{样}})} \quad (4)$$

式中,  $u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})$  为测量重复性引入的相对标准不确定度,  $u_{\text{rel}}(A)$  为仪器引入的相对标准不确定度,  $u_{\text{rel}}(\bar{f})$  为对照品校正因子  $\bar{f}$  引入的相对标准不确定度,  $u_{\text{rel}}(V_{\text{样}})$  为样品定容引入的相对标准不确定度。

## 2.5 标准不确定度分量的评定

### 2.5.1 测量重复性引入的标准不确定度分量

者先前测量过 8 份注射用帕米膦酸二钠的含量, 分别为 97.63%, 97.81%, 98.88%, 99.03%, 98.62%, 98.42%, 97.27%, 97.15%, 均值为 98.10%。

$$s(Y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}} = 0.731\%$$

本次测定是在相同条件下平行测定 2 份样品, 其平均值为 99.29%, 利用此前由较大样本量( $n=8$ )获得的标准偏差预评估值, 计算本次测量结果平均值的相对标准不确定度为:

$$u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}}) = \frac{s(Y)}{\bar{Y}\sqrt{2}} = \frac{0.731}{99.29 \times \sqrt{2}} = 5.21 \times 10^{-3}$$

**2.5.2 仪器引入的不确定度分量** 因为已经引入了测量重复性系数, 故不再考虑对照品以及样品峰面积的重复性影响, 只需考虑离子色谱仪器的影响, 可以用仪器检定的定量重复性来表示。离子色谱仪检定证书给出的结论: 定量重复性  $\leq 1.3\%$ ( $n=6$ ), 假定为均匀分布<sup>[6]</sup>, 包含因子  $k=\sqrt{3}$ , 则相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(A) = \frac{1.3\%}{\sqrt{3}} = 7.51 \times 10^{-3}$$

**2.5.3 对照品校正因子  $\bar{f}$  引入的不确定度分量** 为了简便和易行, 将对照品称量的天平变动性、不同人测定、体积定容差异、环境变动等包含的多个重复性分量合并为 1 个总的重复性分量来评估, 同法增加 1 个重复性系数  $f_{\text{rep}}=1$ 。评定对照品校正因子  $\bar{f}$  不确定度的数学模型见公式(5):

$$\bar{f} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \frac{W_i P_i}{A_i V_i} \right) f_{\text{rep}} \quad (5)$$

①测量重复性引入的标准不确定度分量: 笔者先前测量过 10 份帕米膦酸二钠对照品的  $f$ , 分别为  $3.4997 \times 10^{-2}$ ,  $3.4947 \times 10^{-2}$ ,  $3.4891 \times 10^{-2}$ ,  $3.4798 \times 10^{-2}$ ,  $3.4849 \times 10^{-2}$ ,  $3.4858 \times 10^{-2}$ ,  $3.4782 \times 10^{-2}$ ,  $3.4946 \times 10^{-2}$ ,  $3.5128 \times 10^{-2}$ ,  $3.5165 \times 10^{-2}$ , 均值为  $3.4936 \times 10^{-2}$ 。

$$s(f) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f_i - \bar{f})^2}{n-1}} = 1.30 \times 10^{-4}$$

本次测定是在相同条件下平行测定 2 份对照品, 其  $f$  平均值为  $3.5504 \times 10^{-2}$ , 利用此前由较大样本量( $n=10$ )获得的标准偏差预评估值, 计算本次测量结果平均值的相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(f'_{\text{rep}}) = \frac{s(f)}{f\sqrt{2}} = \frac{1.30 \times 10^{-4}}{3.5504 \times 10^{-2} \times \sqrt{2}} = 2.59 \times 10^{-3}$$

②对照品纯度带来的不确定度分量: 中国食品药品检定研究院提供的帕米膦酸二钠对照品纯度为 99.6%, 纯度标准偏差为 0.4%。假定为均匀分布<sup>[6]</sup>, 包含因子  $k=\sqrt{3}$ , 则相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(P_r) = \frac{0.4\%}{99.6\% \times \sqrt{3}} = 2.32 \times 10^{-3}$$

③对照品称量带来的不确定度分量: 天平按检定证书给出在 0~5 g 之间校正允差为  $\pm 0.00003$  g, 对照品称量为 0.01246 g。假定为均匀分布<sup>[6]</sup>, 包含因子  $k=\sqrt{3}$ , 则相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(W_r) = \frac{0.00003}{0.01246 \times \sqrt{3}} = 1.39 \times 10^{-3}$$

④对照品定容引入的不确定度分量: 对照品定容采用 B 级单标线量瓶为 25 mL, 允差  $a=\pm 0.06$  mL<sup>[7]</sup>, 按三角分布<sup>[6]</sup>, 取包含因子  $k=\sqrt{6}$ , 则相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(V_r) = \frac{a}{V_k} = \frac{0.06}{25 \times \sqrt{6}} = 9.80 \times 10^{-4}$$

对照品峰面积测量带来的不确定度分量来源于峰面积测量重复性和仪器稳定性, 即“2.5.2”项, 此处不再考虑。

故对照品校正因子  $\bar{f}$  引入的相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(\bar{f}) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(f_{\text{rep}}) + u_{\text{rel}}^2(P_r) + u_{\text{rel}}^2(W_r) + u_{\text{rel}}^2(V_r)} = 3.87 \times 10^{-3}$$

**2.5.4 样品定容引入的不确定度分量** 样品定容采用 B 级单标线量瓶为 100 mL, 允差  $a=\pm 0.20$  mL<sup>[7]</sup>, 按三角分布<sup>[6]</sup>, 取包含因子  $k=\sqrt{6}$ , 则相对标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(V_{\text{样}}) = \frac{a}{V_k} = \frac{0.20}{100 \times \sqrt{6}} = 8.16 \times 10^{-4}$$

## 2.6 合成标准不确定度的评定

将  $u_{\text{rel}}(f_{\text{rep}})$ 、 $u_{\text{rel}}(A)$ 、 $u_{\text{rel}}(\bar{f})$ 、 $u_{\text{rel}}(V_{\text{样}})$  的数值带入公式(4), 相对合成标准不确定度如下:

$$u_{\text{rel}}(Y) = \sqrt{u_{\text{rel}}^2(f_{\text{rep}}) + u_{\text{rel}}^2(A) + u_{\text{rel}}^2(\bar{f}) + u_{\text{rel}}^2(V_{\text{样}})} = 9.96 \times 10^{-3}$$

合成标准不确定度如下:

$$u(Y) = u_{\text{rel}}(Y) \times Y = 0.00996 \times 99.29\% = 0.989\%$$

## 2.7 扩展不确定度

取包含因子  $k=2$ (置信概率为 95%), 扩展不确定度  $U(Y)=2u(Y)=1.98\%$ 。

## 2.8 报告与表示

当测定注射用帕米膦酸二钠的含量为标示量的 99.29% 时, 其扩展不确定度  $U(Y)=1.98\%(k=2)$ 。故可表示为:  $Y=(99.29\pm 1.98)\%(k=2)$ 。

## 3 讨论

本实验建立了离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量的测量不确定度的评估方法, 分析影响不确定度的因素, 为客观评价注射用帕米膦酸二钠的含量测定结果提供科学依据。

根据本实验所作的分析, 采用离子色谱法测定注射用帕米膦酸二钠含量时, 离子色谱仪器引入的不确定度影响最大, 受仪器的变动性、操作的差异、体积读数的随机性、样品不均匀和环境条件的变动等各种随机影响引入的重复性不确定度分量  $f_{\text{rep}}$  和对照品溶液校正因子引入的不确定度次之, 定容引入的不确定度贡献微小, 可忽略不计。因此采用离子色谱法测定帕米膦酸二钠含量时, 必须确保仪器和对照品的稳定性。

分析评估结果, 扩展不确定度数值较大, 除仪器稳定性较差外, 还与样品的制备方法有关。中国药典 2010 年版二部规定: 取本品 3 瓶, 分别

加水 10 mL 并定量转移置于 100 mL 量瓶中, 加水分次洗涤容器, 洗液并入量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。因此测得的含量受样品瓶间差异的影响较大。建议改为“取本品 5 瓶, 精密称定, 混匀研细, 精密称取适量(约相当于帕米膦酸二钠 30 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 同时制备相同浓度的对照品溶液。”以此消除瓶间差异, 减小不确定度, 提高分析结果的可信度。

## REFERENCES

- [1] 中国药典. 二部[S]. 2010: 458-459, 附录 38-39.
- [2] 测量不确定度评定与表示 JJF 1059.1-2012[S]. 2012: 8-23.
- [3] LUO S Q, ZHOU Z. Evaluation of measurement uncertainty for the determination of alcohol residue in glycididazole sodium by GC internal standard method [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(2): 173-177.
- [4] QIN L, WANG Y, ZHANG L, et al. Evaluation of uncertainty for the determination of clozapine tablets by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(2): 189-194.
- [5] 王中宇, 刘智敏, 夏新涛, 等. 测量误差与不确定度评定 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 121-183.
- [6] 化学分析中不确定度的评价指南 CNAS-GL06[S]. 2006: 32.
- [7] 常用玻璃量器检定规程 JJG196-2006 [S]. 2006: 7-8.

收稿日期: 2015-09-04

## HPLC 测定利格列汀的有关物质

孙著叶(日照市中医医院, 山东 日照 276800)

**摘要:** 目的 建立梯度洗脱高效液相色谱法测定利格列汀原料杂质的方法。方法 色谱柱为 Agilent C<sub>18</sub> 柱, 流动相 A 为磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钠 2.0 g, 加水 1 000 mL 溶解, 并用磷酸调节 pH 值至 2.5±0.1), 流动相 B 为甲醇-乙腈(55:45), 以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 流速; 检测波长为 226 nm; 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 8-[(3R)-哌啶-3-氨基]-7-(2-丁炔基)-3,7-二氢-3-甲基-1-[(4-甲基-2-噻唑啉基)甲基]-1H-嘌呤-2,6-二酮(杂质 A)、8-[(3R)-3-氨基-1-哌啶基]-7-(3-溴-2-丁烯基)-3,7-二氢-3-甲基-1-[(4-甲基-2-噻唑啉基)甲基]-1H-嘌呤-2,6-二酮(杂质 B)、8-[(3R)-3-甲酰胺基-1-哌啶基]-7-(2-丁炔基)-3,7-二氢-3-甲基-1-[(4-甲基-2-噻唑啉基)甲基]-1H-嘌呤-2,6-二酮(杂质 C)和利格列汀及其他未知杂质均能达到很好的分离, 且杂质 A、杂质 B、杂质 C 与利格列汀分别在 0.59~5.91 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.999\ 9$ ), 0.59~5.86 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.999\ 8$ ), 0.58~5.79 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.999\ 5$ ) 和 1.32~13.22 μg·mL<sup>-1</sup>( $r=0.999\ 7$ ) 内具有良好的线性关系。杂质 A、杂质 B、杂质 C 平均回收率( $n=9$ )分别为 99.12% (RSD=2.9%)、99.35%(RSD=2.4%)和 98.52%(RSD=1.1%)。结论 本方法灵敏快速、准确、可靠, 专属性强, 可作为利格列汀的杂质检查。

**关键词:** 利格列汀; 高效液相色谱; 梯度洗脱; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)04-0451-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.04.017

作者简介: 孙著叶, 女, 主管药师 Tel: (0633)8290907 E-mail: pharm\_2012@126.com