

## GC-MS法测定维格列汀中氨基甲酸乙酯残留的不确定性评估

郑永刚, 靳文仙, 刘爱赞, 张 博, 吴 赞\*

天津药物研究院有限公司, 天津 300110

**摘要:** 目的 用气相-质谱联用(GC-MS)法对维格列汀中氨基甲酸乙酯残留的测定进行不确定度评估。方法 结合氨基甲酸乙酯的实验方法, 建立数学模型, 对实验过程中供试品制备、对照品溶液的配制、样品测量结果的重复性、样品回收率中不确定度来源进行分析。结果 GC-MS法测定维格列汀中氨基甲酸乙酯时, 当取样量为200 mg,  $k=2$  (95%置信度), 测量结果表述为:  $(2.423 \pm 0.069)$  mg/kg。供试品的制备、标准溶液配制过程、重复性、方法回收率对总的不确定度贡献分别为10.33%、15.08%、56.88%、17.71%。结论 氨基甲酸乙酯在测定过程中, 供试品制备、对照品溶液的配制、方法回收率对总的不确定度影响较小, 样品的重复测量是影响测量结果不确定度的主要来源, 在实验过程中应给予控制。

**关键词:** GC-MS法; 维格列汀; 氨基甲酸乙酯; 不确定度

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 02-0260-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.02.015

## Uncertainty evaluation of determination of methyl methanesulfonate residues in vildagliptin by GC-MS

ZHENG Yonggang, JIN Wenxian, LIU Aiyun, ZHANG Bo, WU Yun

Pharmaceutical research institute co.,Ltd., Tianjin, 300110, China

**Abstract: Objective** To evaluate the uncertainty of measurement of ethyl carbamate residues by gas chromatography-mass spectroscopy (GC-MS). **Methods** To test the ethyl carbamate residues, a mathematical model was established. The preparation of test solution, preparation of reference solution, repeatability of sample measurement results and in sample recovery for the source of uncertainty were analyzed. **Results** when the amount of sample was 200 mg,  $k = 2$  (95% confidence), the result was expressed as:  $(2.423 \pm 0.069)$  mg/kg. The contribution of preparation of test sample, preparation process of standard solution, repeatability and method recovery to the total uncertainty was 10.33%, 15.08%, 56.88% and 17.71%, respectively. **Conclusion** Preparation of test solution, preparation of reference solution and sample recovery have little influence for the results, while the repeated measurement are the main factors affecting the uncertainty of the results of detection and analysis of ethyl carbamate residues, and should be given special attention and control during the experiment.

**Key words:** GC-MS; vildagliptin; ethyl carbamate; uncertainty

维格列汀是治疗糖尿病的重要药物, 研究表明, 该药物通过抑制二肽基酶-4(DPP-4), 可有效控制血糖, 同时可减少胰岛 $\beta$ 细胞凋亡, 促进 $\beta$ 细胞再生, 并且耐受性良好, 已广泛应用于糖尿病的治疗<sup>[1]</sup>。氨基甲酸乙酯是该药合成过程中产生的副产物, 有很强的基因毒性, 通过细胞色素P450, 发生基因突变或缺失而引发癌变, 会导致皮肤癌、淋巴瘤和肝癌等疾病, 是一种多位点致癌物, 会进一步影响人体免疫系统, 国际癌症研究机构(IARC)于

2007年将其归类为2A组致癌物<sup>[2-3]</sup>。氨基甲酸乙酯在药物中的残留问题不容忽视, 建立准确可靠的检测方法, 对保证用药安全具有重要意义。

测量不确定度是表征被测定物质真值所在的量程范围的评定结果<sup>[4]</sup>, 随着人们对检测结果的可靠性要求不断提高, 测量不确定度在药物分析领域得到了广泛应用, 对加强制剂质量安全、确保临床应用安全有重要意义。为反映实验结果的科学性, 需对氨基甲酸乙酯的测定进行不确定性评估, 寻找

收稿日期: 2019-07-05

第一作者: 郑永刚(1990—), 男, 陕西人, 研究实习员, 研究方向为仿制药一致性评价。E-mail: zhengyg@tjipr.com

\*通信作者: 吴 赞, 女, 副研究员, 研究方向为新药开发、仿制药一致性评价。E-mail: wuy@tjipr.com

出影响准确度的主要因素,为提高检测水平提供数据支持。本研究通过对比文献<sup>[5-7]</sup>测定方法,筛选出操作性较强、准确度较好的气相-质谱联用(GC-MS)法,并对氨基甲酸乙酯测定中的不确定度进行首次分析和评定,反映出影响其测定不确定度的主要因素,进行重点控制,以提高检测质量。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

气质联用仪 Agilent 7000D, 7890B, G4567A 自动进样器(安捷伦公司); MS105 型半微量天平及 AL104 型分析天平(梅特勒公司)。

### 1.2 主要试剂

氨基甲酸乙酯标准品(百灵威化学技术有限公司,质量分数 98.5%,批号 DZ1411101); 维格列汀片(瑞士诺华制药有限公司,批号 S0111,规格 50mg); 二氯甲烷(色谱级,康科德化工有限公司); 水为蒸馏水。

## 2 方法

### 2.1 GC-MS 条件

载气:高纯氦气;色谱柱:DB-624 毛细管柱(30 m×0.25 mm×1.4 μm);升温程序:起始柱温 60 °C,保持 1 min,以 10 °C/min 上升至 220 °C,维持 10 min;进样口温度 280 °C;体积流量 1.0 mL/min;分流模式:不分流;检测器:MS 检测器;离子源温度:230 °C;溶剂延迟时间:2.5 min;离子化模式:电子轰击离子化模式(DI);进样量:1.0 μL;采集模式:选择性离子检测(SIM);电子能量:70 eV。

### 2.2 对照品溶液的配制

称取氨基甲酸乙酯对照品 10 mg,置 100 mL 量瓶,精密称定,加二氯甲烷溶解,稀释至刻度,作为对照品储备液。精密量取对照品贮备液 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加二氯甲烷稀释至刻度,摇匀对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的配制

精密称取 200 mg 维格列汀样品置 25 mL 具塞刻度试管中,加入 10 mL 的二氯甲烷超声萃取 10 min,静置,全部转移到另一只刻度试管中,清洗样品管 3 次,每次 1 mL,全部转移清洗液;并用氮吹仪将其浓缩至 5 mL 以下,最后用二氯甲烷定容到 5 mL 量瓶,静置,直接取上清液 1 mL 于进样瓶中,待用。

### 2.4 模型建立

氨基甲酸乙酯含量计算公式如下:

$$C_x = \frac{A_x \times C_0 \times V_x}{A_0 \times M}$$

$C_x$ —样品中氨基甲酸乙酯的含量,mg/g;

$C_0$ —对照品溶液中氨基甲酸乙酯的含量,mg/mL;

$A_x$ —样品中氨基甲酸乙酯的峰面积;

$A_0$ —对照品溶液中氨基甲酸乙酯的峰面积;

$V_x$ —样品溶液的定容体积,mL;

$M$ —样品的称样量,g

## 2.5 不确定性来源

氨基甲酸乙酯测定过程中不确定度来源因果图见图 1。

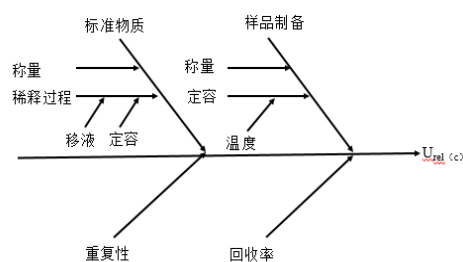


图 1 氨基甲酸乙酯测定过程中不确定度来源因果图  
Fig. 1 Cause-and-effect diagram of uncertainty source during determination of ethyl carbamate

### 2.5.1 供试品制备导致的不确定度

#### 1) 样品称量导致的不确定度

称取 200 mg 样品,天平的系统误差为 ±0.000 5 g,按照均匀分布  $k=\sqrt{3}$ ,则天平的最大允许误差导致的标准不确定度:

$$u_{(m)} = \frac{0.0005}{\sqrt{3}} = 0.00029 \text{ g}$$

样品称量引入的相对标准不确定度:

$$u_{rel(m)} = \frac{u_{(m)}}{m} = 0.00145$$

#### 2) 样品制备导致的不确定度

①A 级 5 mL 容量瓶的容量误差为 0.020 mL,按照三角分布  $k=\sqrt{6}$ ,则样品在定量环节的标准不确定度为:

$$u_{(v,s)} = \frac{0.020}{\sqrt{6}} = 0.00816 \text{ mL}$$

②实验室环境温度在 (20±5)°C,二氯甲烷的膨胀系数为  $1.37 \times 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$ ,按照均分布  $k=\sqrt{3}$ ,则温度变化产生的不确定度:

$$u_{(t)} = \frac{1.37 \times 10^{-3} \times 5 \times 5}{\sqrt{3}} = 0.020 \text{ mL}$$

#### ③样品制备中的合成不确定度

$$u_{(c,s)} = \sqrt{0.00816^2 + 0.020^2} = 0.0216 \text{ mL}$$

相对标准不确定度:

$$u_{rel(v)} = \frac{0.0216}{5} = 0.00432$$

综上,供试品溶液在配制过程中合成不确定度为:

$$u_{(s)} = \sqrt{0.00145^2 + 0.00432^2} = 0.00456$$

### 2.5.2 对照品溶液配制导致的不确定度

①称量标准物质用到十万分之一天平,其不确定度  $U=0.00005\text{ g}$  ( $k=2$ ),使用该天平称取对照品时,引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel(w)} = \frac{0.00005}{2 \times 0.01} = 0.0025$$

②溶液配制过程中,用到玻璃器皿包括 100 mL

量瓶 2 个, 1 mL 刻度吸管 1 支, 各使用 1 次, 符合三角分布  $k = \sqrt{6}$ , 以此来计算相对不确定, 见表 1。

③配制过程中, 溶剂二氯甲烷因温度变化产生的相对不确定度为:

$$U_{rel}(T) = \frac{1.37 \times 10^{-3} \times 5}{\sqrt{3}} = 0.00395$$

综上, 对照溶液配制过程中合成相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(V_R) = \sqrt{0.0025^2 + 2 \times 0.000408^2 + 0.00286^2 + 0.00395^2} = 0.00551$$

表 1 对照溶液配制过程中量器不确定度分析<sup>[8-9]</sup>

Table 1 Uncertainty analysis of gaugein standard solution preparation process

玻璃器具	最大允差/mL	标准不确定度	移取/定容体积/mL	相对标准不确定度
100 mL 单标线容量瓶	±0.10	0.040 8	100	0.000 408
1 mL 单标线吸管 A 级	±0.007	0.002 86	1	0.002 86

### 2.5.3 样品测量结果重复性导致的不确定度

本品最大日剂量 100 mg, 以毒理学关注阈值(TTC) 1.5 μg/d 计算, 目标物控制限度应为 0.001 5% ( $15 \times 10^{-6}$ )<sup>[6]</sup>。根据供试品的制备方法, 进行 6 次测定, 所得氨基甲酸乙酯的质量浓度分别为 2.471、2.428、2.349、2.356、2.421、2.511 mg/kg, 其质量浓度的算术平均值为 2.423 mg/kg, 根据 A 类评定方法, 其相对标准不确定度为:

$$U_{rel}(x_i) = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} = 0.0107$$

### 2.5.4 样品回收率导致的不确定性

由于样品操作过程中, 目标物有萃取过程, 不可避免的有不同程度的损失, 即目标物不能百分之百的进入到测定液, 由资料<sup>[10]</sup>可知, 样品的回收率不确定性按 JJF 1059-1999《测量不确定评定与表示》计算:

$$U_{rel}(R) = \sqrt{\frac{(b_+ \cdot b_-)^2}{9}}$$

$b_+$ =(上限-100), 上限即样品的最高回收率

$b_-$ =(100-下限), 下限即样品的最低回收率

进行了 3 个不同浓度梯度的回收率, 每个梯度平行 3 份, 其最低值是 77.6%, 最高值是 108.0%, 计算得:

$$U_{rel}(R) = 0.00597$$

其总的合成相对标准不确定度为:

$$U_{rel(C)} = \sqrt{U_{rel}(m)^2 + U_{rel}(v)^2 + U_{rel}(V_R)^2 + U_{rel}(X_i)^2 + U_{rel}(R)^2} =$$

0.014 2

扩展不确定度为: 当  $k=2$  时,

$$U = U_{rel} \times k \times \bar{x} = 0.0142 \times 2 \times 2.423 = 0.069 \text{ mg/kg}$$

## 3 结果

GC-MS 法测定氨基甲酸乙酯时, 当取样量为 200 mg,  $k=2$  (95% 置信度), 测量结果表述为: (2.423±0.069)mg/kg。

针对氨基甲酸乙酯制备过程中可能引入误差的环节, 进行了不确定度分析。为体现各分量轻重程度, 根据合成不确定度的计算方法, 各分量所占权重近似采用分量的平方与合成标准不确定度的平方比值<sup>[11]</sup>表示见表 2:

表 2 各分量不确定度汇总

Table 2 Uncertainty summary of each component

不确定度分量	相对标准 不确定度	合成不确 定度	分量权 重/%
供试品制备	0.004 56	0.014 2	10.33%
对照品溶液配制	0.005 51		15.08%
样品重复性	0.010 7		56.88%
样品回收率	0.005 97		17.71%

## 4 讨论

氨基甲酸乙酯具有较强的基因毒性, 其残留必须严格控制, 并且保证检测质量。在测定过程中不可避免的存在不确定度, 测量不确定度可以表征结果的可信赖程度, 对其质量的控制具有极其重要的意义, 在检测过程中重视不确定度的来源, 降低测

定的不确定度,可有效保证检测结果的准确性。

供试品的制备对总的不确定度贡献为10.33%,相对较低。其中称量环节的相对不确定度较小,说明万分之一的天平进行称量可以达到精度的要求,供试品制备环节相对不确定度较大,量具的准确性和温度对体积存在一定的影响,除此之外,操作过程中还应充分考虑溶剂的均匀性以及操作的规范性,同时注意溶剂挥发对体积的影响。

标准溶液配制过程中的不确定度贡献为15.08%,标准物质的称量、稀释和温度都是影响不确定度的重要环节。称量过程中保证天平的正常使用环境,并且进行标准操作;移液过程应娴熟操作;并且保证实验室温度的适宜和恒定。

重复性对总的不确定度贡献为56.88%,是主要影响因素,说明整个方法中随机变量需要进行有效控制,加强气相色谱仪的维护和保养,调整好仪器精密度,实验操作过程中做好样品的转移、保证定量设备的准确,避免残留污染,样品、溶液的均匀性及操作一致性也应该是考虑的重点。

方法回收率对总的不确定度贡献为17.71%,影响相对较低,回收率本身是评价方法准确性的一种手段,至于如何与检测结果的不确定性进行整合,仍需要研究一种合适的评价方式。

#### 参考文献

[1] 李思玲. 维格列汀联用二甲双胍治疗2型糖尿病的疗效和安全性 [J]. 当代医学, 2018, 24(35): 18-20.

- [2] 崔霞, 苗虹, 赵云峰, 等. 发酵食品中氨基甲酸乙酯污染及其毒性研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 9(9): 2617-2622.
- [3] Cha S W, Gu H K, Lee K P, et al. Immunotoxicity of ethyl carbamate in female BALB/c mice: role of esterase and cytochrome P450 [J]. Toxicol Lett, 2000, 115(3): 173-181.
- [4] 全国法制计量管理计量技术委员会. 测量不确定度评定与表示(JJF1059.1-2012) [M]. 北京: 中国计量出版社, 2013.
- [5] 洪冰, 胡婷婷, 郑婷婷, 等. 氨基甲酸乙酯的研究进展 [J]. 农产品加工, 2018(19): 65-68.
- [6] 李曼丽. 氨基甲酸乙酯的分析方法的研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2016.
- [7] 周琛, 陈汉哲, 苏婷, 等. 直接进样气相色谱-质谱法快速测定酒中氨基甲酸乙酯 [J]. 现代预防医学, 2016, 43(4): 715-717, 721.
- [8] 张建挺, 许利光. 100 mL单标线容量瓶容量示值测量值不确定度评定 [J]. 计量与测试技术, 2015, 42(10): 65-66, 68.
- [9] 张茹, 王紫昕, 张文轩, 等. 气相色谱法测定蜂蜜中氟胺氰菊酯的不确定度评定 [J]. 现代食品, 2018(17): 119-122, 126.
- [10] 中国质量技术监督局. 中华人民共和国国家计量技术规范 JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示 [S]. 2012.
- [11] 程文胜, 谢艳红, 向正华, 等. 气相色谱法测定花生中有机氯农药残留的不确定度评定 [J]. 化学工程与装备, 2018(6): 227-230.