

DOI: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2020.112801

雏菊叶龙胆酮快速制备与标准化分析

申 诚^{1,3}, 陈 涛¹, 王岱杰², 王 硕¹, 赵景阳¹, 陈基麟¹, 杨 丽¹, 王 晓^{*2}, 李玉林^{*1}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001; 2. 山东省分析测试中心, 济南 250000; 3. 中国科学院大学, 北京 101408)

摘 要: 以龙胆科獐牙菜属植物抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana* H. Smith) 全草为原料, 建立了基于制备液相色谱技术的雏菊叶龙胆酮快速制备工艺, 从 500 g 抱茎獐牙菜中分离获得 1.66 g 雏菊叶龙胆酮样品, 之后完成纯度分析、结构鉴定、均匀性检查、稳定性检验和定值标准化分析研究。基于 HPLC 技术, 采用不同的检测波长进行纯度测试, 纯度均大于 98%; 基于 LC-MS 对制备的样品进行纯度测试, 未发现明显杂质峰存在; 经¹H-NMR 和¹³C-NMR 确定其结构为 1,5,8-三羟基-3-甲氧基山酮(雏菊叶龙胆酮)。该样品均匀性良好, 4℃条件下 24 个月内稳定性良好, 定值结果确定其纯度为 99.57%, 在 95% 置信区间范围内的相对扩展不确定度为 0.50%。

关键词: 雏菊叶龙胆酮; 快速制备; 均匀性; 稳定性; 定值; 不确定度

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2021)08-0905-06

Rapid preparation and standardization analysis of Bellidifolin

SHEN Cheng^{1,3}, CHEN Tao¹, WANG Daijie², WANG Shuo¹, ZHAO Jingyang¹, CHEN Jilin¹, YANG Li¹, WANG Xiao^{*2}, LI Yulin^{*1} (1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001; 2. Shandong Analysis and Testing Center, Jinan 250000; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408)

Abstract: A rapid preparation process of Bellidifolin from whole herb of *Swertia franchetiana* H. Smith was established by prep-HPLC. As a result, 1.66 g of Bellidifolin was obtained from 500 g of the whole plant. Afterwards, purity analysis, structure identification, homogeneity and stability inspection, and cooperative certification were conducted. HPLC analysis showed the purity of the prepared sample was higher than 98% with no obvious impurity peaks by using different detection wavelengths. The structure was determined as 1,5,8-trihydroxy-3-methoxyxanthone (Bellidifolin) by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. The results indicated that the homogeneity of Bellidifolin was excellent, with good stability within 24 months at 4℃. The certified value of the reference material of Bellidifolin was 99.57% with the expanded uncertainty of 0.50% in confidence coefficient of 95%.

Keywords: Bellidifolin; rapid preparation; homogeneity; stability; certification; uncertain

抱茎獐牙菜(*Swertia franchetiana* H. Smith) 是龙胆科獐牙菜属植物, 俗名藏茵陈, 是西藏、青海等地区最具特色的治疗热症、肝胆病及血病的一大类著名藏药^[1-2]。其主要活性成分为山酮类和环烯醚萜类化合物^[3], 雏菊叶龙胆酮是抱茎獐牙菜中含

量较高的一种山酮类化合物。研究表明, 雏菊叶龙胆酮是一个药理活性确切、功用广泛的山酮类化合物, 相继发现其具有保肝、抑制胆碱酯酶及单胺氧化酶、保护心血管系统及缺血性脑损伤、降血糖等多方面的药理活性^[4-5]。雏菊叶龙胆酮具有广阔

收稿日期: 2020-11-28

基金项目: 国家标准化委员会国家标准样品研复制计划项目(S2017004)、青海省创新平台建设专项项目(2020-ZJ-T02)和青海省重点研发与转化计划项目(2019-SF-123)资助

作者简介: 申 诚, 男(1996-), 硕士研究生。研究方向: 藏药标准化与创新药物研究, santos960114@163.com

* 通信作者: 李玉林, 男(1970-), 博士, 研究员。研究方向: 藏药标准化与创新药物研究, liyulin@nwipb.cas.cn

王 晓, 男(1971-), 博士, 研究员。研究方向: 中药质量控制与评价, 天然产物提取分离及应用, wangx@sdas.org

的开发和利用前景,目前国内外还没有雏菊叶龙胆酮化合物的标准样品。本研究建立了抱茎獐牙菜中雏菊叶龙胆酮的快速制备工艺和标准化研究,为雏菊叶龙胆酮标准样品的研制提供前期基础。

1 实验部分

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);岛津 LC-8A 高效制备液相色谱仪(日本岛津公司);R1020 旋转蒸发器(郑州长城科工贸公司);GLZY-0.5B 真空冷冻干燥机(上海浦东冷冻干燥设备公司)。Agilent 6520 Q-TOF 液相质谱仪(美国安捷伦公司);Bruker AM 400 MHz 核磁共振波谱仪(美国布鲁克公司)。

1.2 试剂

高效液相色谱用甲醇为色谱纯(山东禹王公司),水为超纯水,其余试剂为 AR。

1.3 原料药材

抱茎獐牙菜采自青海省大通县宝库乡,由中国科学院西北高原生物研究所孙菁研究员鉴定为龙胆科植物抱茎獐牙菜。

2 实验方法

2.1 样品制备

取干燥的抱茎獐牙菜药材 500 g,切成 1 cm 小段,用 7.5 L 的 70% 乙醇 70℃ 回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,离心并浓缩至无醇味后冷冻干燥,得抱茎獐牙菜提取物。称取抱茎獐牙菜提取物,用水加热溶解,过滤,静置得沉淀物。将沉淀物用 DMSO 助溶后,甲醇稀释,注入到 prep-HPLC 中分离纯化,得到雏菊叶龙胆酮洗脱组分。色谱柱为 Reprosil 100 C₁₈(250 mm × 30 mm id, 10 μm);检测波长 253 nm;流速:40 mL/min;流动相为甲醇-水,80% 甲醇等度洗脱。

2.2 纯度分析

2.2.1 HPLC 纯度分析 分析条件:Platisil ODS C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相:甲醇-0.5% 乙酸水溶液 = 85/15 (V/V)。流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;运行时间:30 min;检测波长:210,230,253,280,300,320,340,360 nm。

2.2.2 LC-MS 纯度分析 分析条件:色谱柱:Agela Innoval C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.5% 乙酸水溶液 = 85/15 (V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;运行时间:30 min。MS 条件如下:ESI 电喷雾离子源,正离子模式,毛细管电压 4.0 kV,载气: N₂,载气流速:10 L/min,载气温度:550℃,扫描范围为 $m/z = 50 \sim 1500$ 。

2.3 结构确证

以 DMSO-*d*₆ 为溶剂,采用¹H-NMR 和¹³C-NMR 进行结构确认。

2.4 分装和储存

在相对独立和洁净空间中以每瓶 10.00 mg 进行分装,采用进口 4 mL 棕色瓶,共 120 瓶,以 1~120 号计。分装好的样品瓶放在 4℃ 冰箱中保存。

2.5 均匀性检验

从分装后的样品中随机抽取 10 瓶并编号,按随机顺序重复测量的方法,分别从每瓶中称取 0.5 mg 样品 3 份,每份样品分别用 1.0 mL 色谱甲醇溶解,按 2.2.1 方法分析,用峰面积归一法读取样品的纯度值,然后用方差分析 F 检验法进行均匀性检验。

2.6 稳定性检验

2.6.1 加速稳定性检验 从分装后的样品中随机抽取 15 瓶样品,3 瓶一组分别放置于 -20℃, 2℃~8℃,20℃,40℃,60℃ 保存。本研究以 6 d 为周期,对制备的雏菊叶龙胆酮样品按 2.2.1 节分析,每份试样以测定 2 次的平均值为其定值结果。同时选取乙腈和甲醇为保存溶剂,考察雏菊叶龙胆酮样品溶液稳定性进行。

2.6.2 长期稳定性检验 将本样品分装后,于 4℃ 冰箱中冷藏保存,本研究以 2 年为周期,对制备的雏菊叶龙胆酮样品每 6 个月取 1 次样检验,按 2.2.1 节分析,每份样品连续进样 5 次,峰面积归一化法求出纯度^[6-7],平均值为其定值结果并用 t 检验对数据进行统计分析^[8],样品的稳定性是用来描述样品的特性值随时间的变化。

2.7 定值

采用 8 个具有资质的实验室协作试验定值。随机抽取 24 瓶样品,每个定值实验室送 3 瓶,每瓶平行测定 2 次。定值实验室将样品配成一定浓度的溶液,高效液相色谱仪测定,采用峰面积归一化法进行纯度定值,对所采集的测定结果,采用的格拉布斯(Grubbs)检验法进行检验与数据处理^[9]。

$$\text{测定总平均值: } X = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}{N} \quad (1)$$

$$\text{实验室内重复性标准偏差: } S_r^2 = MS_{\text{within}} \quad (2)$$

$$\text{实验室间再现性标准偏差: } S_L^2 = (MS_{\text{among}} - MS_{\text{within}}) / n_0 \quad (3)$$

$$\text{实验室总平均值的标准偏差: } S_{\bar{x}} = \sqrt{S_L^2 / p + S_r^2 / np} \quad (4)$$

N: 测定总次数; P: 定值实验室个数; n: 每个实验室测量次数

2.8 不确定度评价

雏菊叶龙胆酮标准样品的总不确定度由 5 部分合成: 分别是标准样品定值分析引入的不确定度、均匀性引入的不确定度、短期稳定性引入的不确定度、长期稳定性引入的不确定度组成。

$$u(\bar{x}) = S(\bar{x}) \quad (5)$$

$$S_{bb}^2 = (MS_{among} - MS_{with}) / n \quad (6)$$

稳定性不确定度:

$$u_{ls} = S(b_1) = \frac{S}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \quad (7)$$

扩展不确定度:

$$u_{CRM} = 2 \sqrt{u(x)^2 + u_{bb}^2 + u_{ls}^2 + u_{sts}^2} \quad (8)$$

3 实验结果

3.1 样品的制备与分离

提取浓缩后共得到抱茎獐牙菜提取物 110 g, 沉淀物 3.27 g, HPLC 分析如图 1 所示。

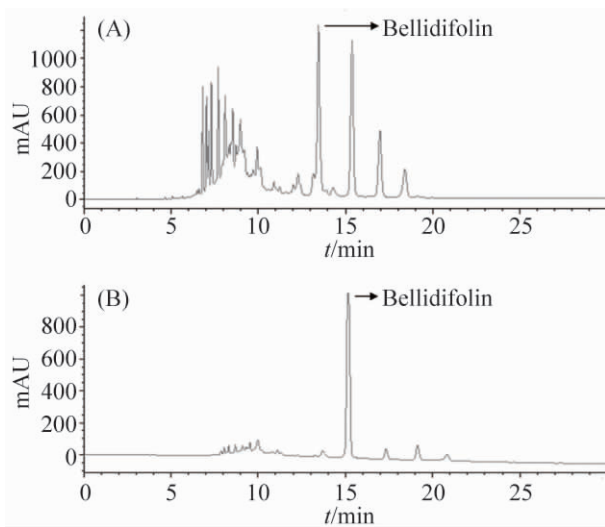


图 1 抱茎獐牙菜提取物 (A) 和沉淀物 (B) 的 HPLC 分析图谱

Fig. 1 HPLC chromatography of extractive (A) and sediment (B) (253 nm)

在 prep-HPLC 条件的优化时, 流速与流动相对分离效果影响明显。通过公式 $F_p = F_a \times (D_p / D_a)^2$ 计算^[10], 得到 prep-HPLC 最优流速为 40 mL/min, 式中 F_p 为 prep-HPLC 的流速, F_a 为 HPLC 的流速, D_p 和 D_a 分别为制备柱与分析柱的直径。

以 HPLC 分析条件为依据, 进样量为 100 mg/5 mL, 检测波长为 253 nm 的条件下, 首先采用甲醇 - 0.5% 乙酸水溶液 = 85/15 (V/V) 为流

动相等度洗脱, 未实现较好的基线分离。本研究逐步降低甲醇浓度改善分离效果。当甲醇浓度低于 78% 时, 可以实现较好的基线分离, 但甲醇浓度越低, 分离时间越长。为减少分离时间, 提高分离效率, 本研究选用 78% 甲醇等度洗脱。采用上述条件从 3.27 g 沉淀物中共分离得到 1.66 g 雏菊叶龙胆酮样品。分离色谱图如图 2 所示。

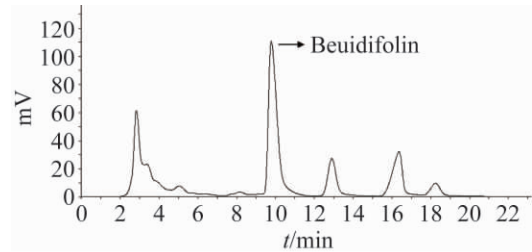


图 2 雏菊叶龙胆酮样品制备液相色谱分离图 (253 nm)
Fig. 2 Prep-HPLC chromatogram of Bellidifolin (253 nm)

3.2 纯度分析

3.2.1 HPLC 纯度分析 在不同检测波长下, 对样品色谱峰进行面积归一法定量, 经积分, 除去溶剂峰外, 雏菊叶龙胆酮样品纯度均大于 98%, 未发现明显的杂质峰存在 (如图 3)。

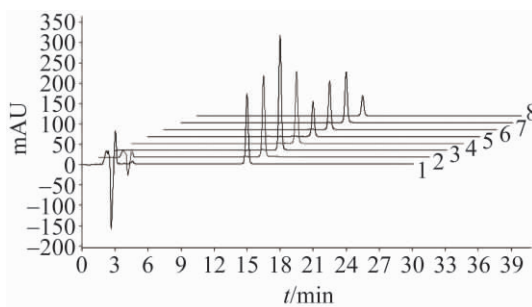


图 3 雏菊叶龙胆酮制备样品纯度检测图

Fig. 3 Chromatogram for sample purity test

1 - 210 nm; 2 - 230 nm; 3 - 253 nm; 4 - 280 nm; 5 - 300 nm; 6 - 320 nm; 7 - 340 nm; 8 - 360 nm

3.2.2 LC-MS 纯度分析 正负离子模式下总离子流图如图 4 和图 5 所示, 未发现明显杂质峰存在。

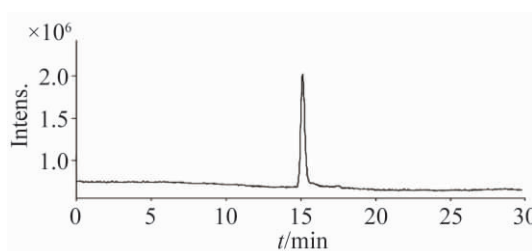


图 4 雏菊叶龙胆酮正离子模式下总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of Bellidifolin in positive ion mode

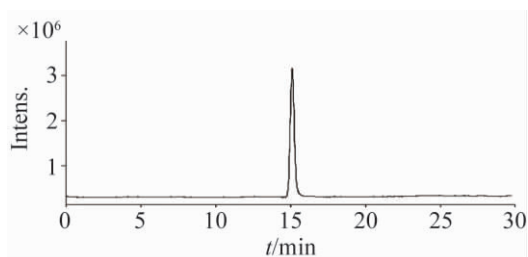


图5 雏菊叶龙胆酮负离子模式下总离子流图

Fig.5 Total ion chromatogram of Bellidifolin in negative mode

3.3 结构鉴定

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.26 (1H, d, J=8.8 Hz, H-6), 6.64 (1H, d, J=8.8 Hz, H-7), 6.59 (1H, s, H-4), 6.37 (1H, s, H-2), 3.89 (3H, s, OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 184.5 (C-9), 167.5 (C-3), 162.4 (C-1), 157.8 (C-4a), 152.3 (C-8), 143.8 (C-4b), 137.8 (C-5), 124.3 (C-6), 110.0 (C-7), 108.0 (C-8a), 102.6 (C-

8b), 97.9 (C-2), 93.4 (C-4), 56.7 (OCH₃)。与文献^[11] 比对,确定其结构为1,5,8-三羟基-3-甲氧基山酮(雏菊叶龙胆酮),结构如图6所示。

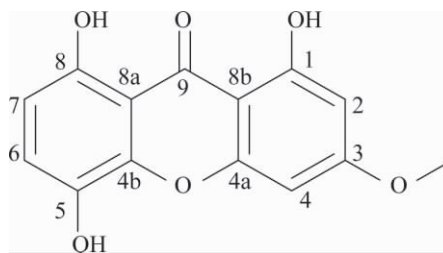


图6 雏菊叶龙胆酮的化学结构式

Fig.6 Chemical structural formula

3.4 均匀性检验

总体平均值 99.87%, 以 v₁(即组间) = 9 及 v₂(即组内) = 20 查 F 界值表, 得 F_{0.05}(9, 20) = 2.39, 由于 F = MS_间 / MS_内 = 1.5 < F_{0.05}(9, 20), 所以本样品是均匀的。结果见表1和表2。

表1 雏菊叶龙胆酮样品均匀性检验

Table 1 Homogeneity test of Bellidifolin

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mean/%	99.86	99.86	99.87	99.86	99.85	99.89	99.87	99.86	99.87	99.87

表2 雏菊叶龙胆酮样品均匀性研究的方差分析

Table 2 Variance analysis of homogeneity test of Bellidifolin

Variation source	Stdev square	Degree freedom	Mean square
Among	0.002 253	9	0.000 25
Within	0.003 333	20	0.000 167
Total	0.005 587	29	

从表2可见,组间方差用式(9)计算:

$$s_A^2 = \frac{0.00025 - 0.000167}{3} = 2.77 \times 10^{-5} \quad (9)$$

组间标准偏差是该方差的平方根:

$$s_{bb} = \sqrt{0.0000277} = 0.01 \quad (10)$$

重复性标准偏差可由 MS_{within} 计算:

$$s_r = \sqrt{MS_{within}} = \sqrt{0.000167} = 0.02 \quad (11)$$

均匀性检验的不确定度 ubb = sbb = 0.01

3.5 稳定性检验

3.5.1 加速稳定性 从表3数据看,雏菊叶龙胆酮样品在5个不同温度下放置6d后测得样品平均纯度为99.82%,且在甲醇或乙腈为保存液时较为稳定。

表3 雏菊叶龙胆酮样品加速稳定性检验

Table 3 Accelerated stability test of Bellidifolin

Temperature / °C	Mean / %	RSD / %	Uncertainty / %
-20	99.79	0.02	
2~8	99.85	0.02	
20	99.84	0.02	0.03
40	99.82	0.03	
60	99.81	0.02	

在6d的时间内雏菊叶龙胆酮在甲醇、乙腈2种溶剂保存中均具有较好的溶液稳定性。为获得更加准确的实验结果,建议该样品在配制后48h内使用完毕。

3.5.2 长期稳定性 从表4数据可得,每次测得的平均值在测定时间内没有随时间的变化而明显的升高或降低。

置信度为95%的扩展不确定度为0.24%, T检验:自由度为 n = 2 和 p = 0.95 (95% 置信水平) 的分布 t 因子等于 3.182。由于 |b₁| < T_{0.95, n-2} S (b₁) = 3.182 × 0.01 = 0.03182, 即: |b₁| < 0.03182, 所以,斜率的变化不显著,因而雏菊叶龙胆酮样品在2年内未观测到明显的不稳定性。

表 4 雏菊叶龙胆酮样品长期稳定性检验

Table 4 Long-term stability test of Bellidifolin

Time/month	Mean/%	RSD/%	Uncertainty /%
0	99.85	0.02	
6	99.87	0.02	
12	99.83	0.03	0.24
18	99.84	0.02	
24	99.79	0.02	

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} = \frac{-0.90}{360} = -0.0025 \quad (12)$$

式中: $\bar{Y} = 99.84$, $\bar{X} = 12$

$$\text{截距由式 (13) 计算: } b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X} = 99.84 + (0.0025 \times 12) = 99.87 \quad (13)$$

直线上的点的标准偏差可由式(14)计算:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1 X_i)^2}{n-2} = \frac{0.002}{3} = 0.001 \quad (14)$$

取其平方根 $s = 0.04$, 与斜率相关的不确定度用式(15)计算:

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} = \frac{0.04}{\sqrt{360}} = 0.01 \quad (15)$$

有效期 $t = 24$ 个月的长期稳定性的不确定度的贡献为: $u = sb. t = 0.01 \times 24 = 0.24$

3.6 定值分析

雏菊叶龙胆酮纯度定值结果汇总如表 5 所示。

对所采集的测定结果, 采用的 Grubbs 检验法

表 6 雏菊叶龙胆酮标准样品定值结果统计分析表

Table 6 Variance analysis of linear regression of Bellidifolin

No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Mean/%	99.87	99.63	99.69	99.73	99.78	99.75	99.76	99.83
RSD/%	0.03	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.03	0.04
Total mean/%	99.76							
Sr/%	0.04							
S _L /%	0.08							
s(\bar{x})/%	0.03							

4 结论

以抱茎獐牙菜全草为原料, 建立了雏菊叶龙胆酮的快速制备工艺, 再经过纯度分析、结构鉴定后, 完成了均匀性检查、稳定性检验和定值标

表 5 协作定值数据

Table 5 Results of purity value

No.	Mean/%	RSD/%
1	99.87	0.03
2	99.63	0.05
3	99.69	0.05
4	99.73	0.05
5	99.78	0.05
6	99.75	0.04
7	99.76	0.03
8	99.83	0.04

进行检验, 未发现异常值, 测定结果呈正态分布。根据 GB/T 15000.3 - 2008 标准规定^[14], 定值结果由标准值和不确定度组成。扣除水分和灰分后, 依据高效液相色谱法峰面积归一法所得测定结果, 雏菊叶龙胆酮样品的标准值为 $(1 - 0.10\% - 0.09\%) \times 99.76\% = 99.57\%$, 统计分析结果如表 6 所示。

3.7 定值结果的不确定度评定

总不确定度按

$$u_{CRM} = 2 \sqrt{u(\bar{x})^2 + u_{bb}^2 + u_{ls}^2 + u_{sts}^2} \text{ 计算, 结果如表 7 所示。}$$

表 7 不确定度

Table 7 Uncertainty

$u(\bar{x}) / \%$	$u_{bb} / \%$	$u_{sts} / \%$	$u_{ls} / \%$	$u_{CRM} / \%$
0.03	0.01	0.03	0.24	0.50

雏菊叶龙胆酮标准样品的 HPLC 纯度定值结果为: 标准值: 99.57%, 置信度为 95% 的不确定度值: 0.50%。

准化研究, 为雏菊叶龙胆酮标准样品的研制提供了研究基础。该样品可用于雏菊叶龙胆酮含量测定、检测方法评定、相关产品的检测与质量控制。

参考文献

- [1] Li D M, Xiao H, Liu G M. J Dali Univ, 2007, 6(2) : 77.
李冬梅, 肖怀, 刘光明. 大理学院学报, 2007, 6(2) : 77.
- [2] Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan medicine volunteers [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991.
中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1991.
- [3] Guo A H. J Shanxi Univ Chin pharm, 2005, 6(1) : 57.
郭爱华. 山西中医学院学报, 2005, 6(1) : 57.
- [4] Zhou Y F, Huang Q J, Wu M Z. Guangzhou Chem Industry, 2014, 42(11) : 9.
周永福, 黄琼俭, 吴明珠. 广州化工, 2014, 42(11) : 9.
- [5] Fan D M, Liu Y, Tang L. Nat Prod Res Dev, 2017, 29(3) : 503.
樊冬梅, 刘越, 唐丽. 天然产物研究与开发, 2017, 29(3) : 503.
- [6] Liu Y Y, Li C N, Shi X J, Li P S, Wei Y, Li B, Wang D C, Xu T H, Liu T H. Chin Arc Chin Medic, 2015, 33(9) : 2246.
刘洋洋, 李春娜, 时晓娟, 李朋收, 魏颖, 李博, 王东超, 徐瞰海, 刘铜华. 中华中医药学刊, 2015, 33(9) : 2246.
- [7] Ji L J, Bao Y, Cen G C, Zhao M C, Sun H F. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sin, 2004, 24(7) : 1298.
纪兰菊, 保怡, 陈桂琛, 赵明存, 孙洪发. 西北植物学报, 2004, 24(7) : 1298.
- [8] Ma Y C, Wu C, Wang W, Wang C, Du N, Wu X Y, Li C, Chao Z M. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(20) : 51.
马玉翠, 吴翠, 王尉, 王淳, 杜宁, 吴晓毅, 李春, 巢志茂. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(20) : 51.
- [9] Ma Y C, Wu C, Wang W, Wang C, Du N, Liu H P, Wu X Y, Chao Z M. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(9) : 51.
马玉翠, 吴翠, 王尉, 王淳, 杜宁, 刘海萍, 吴晓毅, 巢志茂. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9) : 51.
- [10] Zou D L, Chen T, Chen C, Li H M, Liu Y L, Li Y L. J Chromatogr Sci, 2016, 54(7) : 45.
- [11] Liu Y Y, Li P S, Liu C N, Shi X J, Xu T H, Liu T H. J Tradit Chin Med Pharm, 2015, 21(2) : 26.
刘洋洋, 李朋收, 李春娜, 时晓娟, 徐瞰海, 刘铜华. 中医药导报, 2015, 21(2) : 26.
- [12] GB/T15000. 1-1994 State the general requirements for standard samples in the technical standard [S].
GB/T15000. 1-1994 标准样品工作导则(1) 在技术标准中陈述标准样品的一般规定 [S].
- [13] GB/T 15000. 2-1994 Common terms and definitions for standard samples [S].
GB/T15000. 2-1994 标准样品工作导则(2) 标准样品常用术语和定义 [S].
- [14] GB/T15000. 3-2008 General principles and statistical methods for determining values of standard samples [S].
GB/T15000. 3-2008 标准样品工作导则(3) 标准样品定值的一般原则和统计方法 [S].