

# 枳实中辛弗林分离纯化及其标准样品定值与不确定度研究

林涛<sup>1,2</sup>, 邵金良<sup>1</sup>, 李茂萱<sup>1</sup>, 邹艳虹<sup>1</sup>, 杨东顺<sup>1</sup>, 刘兴勇<sup>1</sup>, 刘宏程<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所; <sup>2</sup>农业农村部农产品质量安全风险评估实验室, 昆明 650205

**摘要:** 为了提高枳实药材、柑橘类水果中辛弗林分析测定的准确度和质量评价的一致性, 本研究开展了辛弗林标准样品的研究。利用现代分离纯化手段, 从枳实中分离得到辛弗林高纯度单体化合物, 分别采用质量平衡法和定量核磁共振两种不同原理定值方法对辛弗林标准样品进行纯度定值。利用高效液相色谱, 通过  $F$  检验和  $t$  检验对辛弗林标准样品的均匀性进行考察, 利用模拟长途运输条件, 对辛弗林的短期稳定性和长期稳定性进行考察, 并对辛弗林标准样品的定值、均匀性和稳定性研制过程中的不确定度进行评定。结果表明, 辛弗林标准样品的定值结果为 99.62%, 均匀性良好, 在 6 个月内稳定性较好, 扩展不确定度为 0.8% ( $k=2$ ), 量值准确、均匀性和稳定性符合标准样品的技术要求。

**关键词:** 辛弗林; 定值; 均匀性; 稳定性; 不确定度

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)3-0449-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.3.015

## Research on the certification and uncertainty of synephrine reference material isolated and purified from tamping

LIN Tao<sup>1,2</sup>, SHAO JIN-liang<sup>1</sup>, LI Mao-xuan<sup>1</sup>, ZOU Yan-hong<sup>1</sup>,  
YANG Dong-shun<sup>1</sup>, LIU Xing-yong<sup>1</sup>, LIU Hong-cheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Quality standards & Testing Technique, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China;

<sup>2</sup>Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Kunming), Ministry of Agriculture and Rural, Kunming 650205, China

**Abstract:** In order to improve the accuracy and quality evaluation of the simvaline analysis, this paper carried out the study of the standard sample of synephrine. The high-purity monomer compound of synephrine was isolated from the *Citrus aurantium* L. by modern separation and purification methods. The purity of the synephrine reference material was determined by mass balance method and quantitative nuclear magnetic method. The homogeneity of the synephrine reference material was investigated by  $F$ -test and  $t$ -test coupled with high performance liquid chromatography (HPLC). The short-term stability and long-term stability of synephrine were investigated by simulating long-distance transportation conditions. The results showed that the standard value of the synephrine reference material was 99.62%, with an extended uncertainty of 0.8% ( $k=2$ ). The homogeneity of the synephrine standard material is good and the stability is good within 6 months. The accuracy, uniformity and stability of the quantity meet the technical requirements of the secondary standard substance.

**Key words:** synephrine; quality; homogeneity; stability; uncertainty

辛弗林是枳实中的主要活性成分之一, 枳实是从芸香科植物酸橙 (*Citrus aurantium* L.) 的幼果经干燥后所得<sup>[1]</sup>。辛弗林具有逐风理气, 促进食欲等药理作用<sup>[2]</sup>, 辛弗林无副作用和阳性反应<sup>[3]</sup>, 常作为天然兴奋剂及减肥药物中的有效成分而广泛应用

于医药、食品等保健品行业<sup>[4,5]</sup>。

鉴于辛弗林较好的功能活性, 其在枳实药材、柑橘类水果品质评价方面具有重要的作用<sup>[6-8]</sup>。近年来, 对于辛弗林的研究主要包括了提取工艺<sup>[9,10]</sup>和测定方法<sup>[11-15]</sup>方面的研究, 这些研究都是基于辛弗林对照品而展开的, 但是这些对照品的纯度较低, 缺乏严格的定值程序, 纯度量值准确度较低, 无法满足标准样品的要求, 严重限制了相关产品中辛弗林的准确定量及相关的品质分析、质量评价等方面的研

收稿日期: 2018-08-01 接受日期: 2019-01-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFF0201806); 云南省科技惠民专项 (农业) 重点项目 (2014RA054)

\* 通信作者 Tel: 86-871-65140430; E-mail: liuorg@163.com

究。因此,为了提高辛弗林分析测定的准确度和质量评价的一致性,开展辛弗林标准样品的研究具有十分重要的意义。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

制备色谱:P270 II,大连依利特公司;高效液相色谱仪:Alliance 2695e型,美国Waters公司;气相色谱仪:TRACE 1310型,附带TriPlus? 300型顶空自动进样器,氢火焰离子化检测器(FID),美国Thermo Fisher公司;质谱仪:API 4000型,美国AB公司;核磁共振谱仪:AVANCE III 600 MHz型,美国Bruker公司;红外光谱仪:NICOLET NEXUS 470FT-IR型,美国热电公司;热重分析仪:Pyris1 TGA型,美国Perkin Elmer公司;卡尔费休水分测定仪:TOLEDO DL39型,瑞士METTLER TOLEDO公司;XBridge BEH C<sub>18</sub> OBD色谱柱,19 mm × 250 mm,5 μm,美国Waters公司;CAPCELL PAK MG II C<sub>18</sub>色谱柱:4.6 mm × 250 mm,5.0 μm,日本Shiseido公司;电子分析天平:AE-100型,瑞士METTLER TOLEDO公司;超声波清洗机:KQ5200DA型,昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发器:Hei-VAP Value Digital型,德国海道夫公司。

枳实样品:购于云南省昆明市药材市场;AB-8大孔吸附树脂:上海源叶生物科技有限公司;尼泊金乙酯:纯度99.7%,国家二级标准样品,编号为GBW(E)100064,中国计量科学研究院;氘代甲醇:美国Sigma公司;95%乙醇:分析纯,国药集团太仓沪试剂有限公司;氨水:分析纯,25.0%~28.0%,国药集团太仓沪试剂有限公司;甲醇:色谱纯,德国Merck公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 辛弗林纯度标准样品的分离纯化

参考文献<sup>[16]</sup>中的提取和分离纯化方法,称取枳实粉约5 kg,加入30 L纯水后80℃超声提取2次后将提取液合并后减压浓缩后得到枳实水提物1.0 kg,再加入20 L纯水复溶后,利用氨水调节pH至7.5左右,上样量为3 BV,流速为2 BV/h,纯水洗脱至无色后,利用20%乙醇以1 BV/h的流速洗脱,收集洗脱液至3 BV,浓缩干燥后利用甲醇复溶,利用制备色谱进一步纯化,制备色谱条件:流动相为甲醇:水(15:85),进样量:2 mL;流速:15 mL/min;柱温:30℃,检测波长220 nm。经制备色谱纯化得到辛弗林标准样品候选物3 g。

#### 1.2.2 定性分析

采用红外光谱、质谱紫外和核磁分别对辛弗林标准样品候选物的结构进行表征与鉴定。

#### 1.2.3 标准样品分装

辛弗林标准样品经定性确证后,利用2 mL棕色广口钳口瓶进行分装,分装150瓶,每瓶为10 mg,低温下储存。

#### 1.2.4 均匀性检验

均匀性检验的步骤参照GB/T 15000-2008《标准样品工作导则》,分别从已分装的辛弗林中随机抽取20瓶,利用甲醇配制为1.0 mg/mL浓度的溶液,利用液相色谱进行分析测定,每瓶测定3次,并利用液相色谱-面积归一化法计算辛弗林的含量,同时进行均匀性检验(*F*检验)。

#### 1.2.5 稳定性考察

1.2.5.1 长期稳定性考察。长期稳定性考察时间采用先密后疏的原则,分别在第0、1、3、6个月进行稳定性检测。检验方法与均匀性检验相同,即液相色谱-面积归一化法,操作步骤为:每次考察时分取2个包装,每个包装用甲醇配制为浓度1.0 mg/mL的溶液进行测定,每个包装平行测定3次并计算平均值,再将2个包装的测定结果平均值作为最终的检测结果,计算相对标准偏差。

1.2.5.2 短期稳定性考察。短期稳定性考察也是遵循先密后疏的原则,分别于第0、3、5、7、14天进行样品的稳定性考察。为了模拟长途运输过程中的温度,各取20个包装分别置于20℃和40℃的恒温箱中储存并定期检验,检验方法与均匀性检验相同。

#### 1.2.6 辛弗林标准样品定值

根据GB/T 15000-2008《标准样品工作导则》的规定,标准样品定值时需采用两种不同原理的方法进行定值。因此,本研究中根据辛弗林的相关物理和化学性质,选取质量平衡法和定量核磁法两种不同原理方法对辛弗林标准样品进行定值,具体方法如下。

1.2.6.1 质量平衡法的测定方法参考文献<sup>[17-21]</sup>中的方法,主要包括了利用液相色谱-面积归一化法进行主成分含量分析、卡尔费休库伦法测定水分含量、TGA法测定灰分含量、顶空气相色谱法测定挥发性杂质含量以及利用ICP-MS测定无机元素含量等,按式(1)计算辛弗林的纯度。

$$P_1 = P_0 \times (1 - X_w - X_n - X_v) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $P_1$ ——样品纯度,%;

- $P_0$ ——辛弗林的含量, %;  
 $X_w$ ——水分含量, %;  
 $X_n$ ——非挥发性杂质含量, %;  
 $X_v$ ——挥发性杂质含量, %。

1.2.6.2 核磁定量法主要步骤: 分别称取辛弗林纯度标准样品和尼泊金乙酯 4.2 mg 和 5 mg, 再加入 0.5 mL 氘代甲醇溶解, 混匀后<sup>1</sup>H-NMR 测定。按式(2)计算辛弗林的纯度。

$$P_2 = \frac{I_x}{I_{std}} \times \frac{n_{std}}{n_x} \times \frac{M_x}{M_{std}} \times \frac{m_{std}}{m_x} \times P_{std} \quad (2)$$

式中:  $P_2$ ——采用核磁共振法测得的被测物的纯度, %;

- $I_x$ ——样品指定峰的积分面积, %;  
 $I_{std}$ ——内标物指定峰的积分面积;  
 $n_{std}$ ——内标物指定峰的核群核个数;  
 $n_x$ ——样品指定峰的核群核个数;  
 $M_x$ ——样品的相对分子质量;  
 $M_{std}$ ——内标物的相对分子质量;  
 $m_{std}$ ——内标物添加的质量;  
 $m_x$ ——样品的称样量;  
 $P_{std}$ ——内标物的纯度, %。

### 1.2.7 不确定度研究

不确定度  $u_{CRM}$  主要包括了标准样品定值过程引

$$u_{NMR} = P_{NMR} \times \sqrt{\left[\frac{u(I_x/I_{std})}{I_x/I_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(M_x)}{M_x}\right]^2 + \left[\frac{u(M_{std})}{M_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(m_x)}{m_x}\right]^2 + \left[\frac{u(m_{std})}{m_{std}}\right]^2 + \left[\frac{u(P_{std})}{P_{std}}\right]^2}$$

## 2 实验结果

### 2.1 定性结果分析

#### 2.1.1 红外光谱分析

辛弗林的红外光谱如图 1 所示, 3 393.30  $\text{cm}^{-1}$  特征峰为 O-H 的伸缩振动峰, 2 949.72 和 2 870.50  $\text{cm}^{-1}$  特征峰为  $\text{CH}_3$  和  $\text{CH}_2$  的伸缩振动峰, 1 004.52

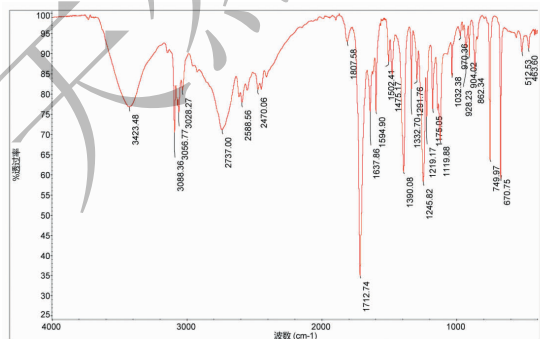


图 1 辛弗林的红外光谱

Fig. 1 Infrared spectrum of synephrine

入的不确定度  $u_{char}$ 、均匀性引入的不确定度  $u_{bb}$ 、短期稳定性引入的不确定度  $u_{lts}$  和长期稳定性引入的不确定度  $u_{sts}$  四个部分, 相关计算公式如下:

$u_{CRM} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{bb}^2 + u_{lts}^2 + u_{sts}^2}$ , 其扩展不确定度为  $U = k \times u_{CRM}$ , 式中  $U$  为标准样品的扩展不确定度, 包含因子  $k = 2, 95\%$  置信水平。

$$u_{char} = \frac{\sqrt{u_{MB}^2 + u_{NMR}^2}}{2}$$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{S_1^2 - S_2^2}{n}}$$
, 其中  $S_1$  和  $S_2$  分别为均匀性试验中组间方差和组内方差。

$$u_{lts} = s(b_{lts}) \times t$$

$$u_{std} = s(b_{std}) \times t$$

$$u_{MB} = \sqrt{u_1^2 + u_2^2 + u_3^2 + u_4^2 + \frac{u_{X_w}^2 + u_{X_n}^2 + u_{X_v}^2}{(1 - X_w - X_n - X_v)^2}}$$

其中  $u_1$  为利用液相色谱法定性测量的重复性引入的不确定度,  $u_2$  为杂质在不同检测波长下响应差异引入的不确定度,  $u_3$  为仪器检测线性引入的不确定度,  $u_4$  为仪器检出限引入的不确定度,  $u_{X_w}$  为水分测定引入的不确定度,  $u_{X_n}$  为非挥发性杂质测定引入的不确定度,  $u_{X_v}$  为挥发性杂质测定引入的不确定度。

$\sim 1\ 604.95\ \text{cm}^{-1}$  提示为单、双键的伸缩振动区, 其中 1 247.88、1 159.59 和 1 057.62  $\text{cm}^{-1}$  为 C-O 的伸缩振动。

#### 2.1.2 紫外光谱分析

辛弗林的紫外光谱如图 2 所示, 辛弗林在 190 nm 和 220 nm 处具有较强的紫外吸收, 其中 190 nm 提示结构中含有 R-OH 结构。

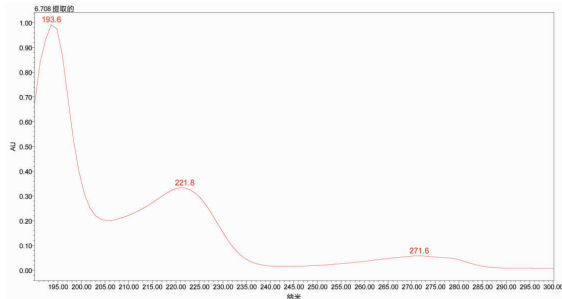


图 2 辛弗林的紫外光谱

Fig. 2 UV spectrum of synephrine

### 2.1.3 质谱分析

通过对辛弗林进行质谱分析,在正离子模式下,扫描范围为 100 ~ 300  $m/z$ ,图 3 所示,其母离子 167.8  $m/z$  为  $[M + H]^+$ ,初步确定为辛弗林。

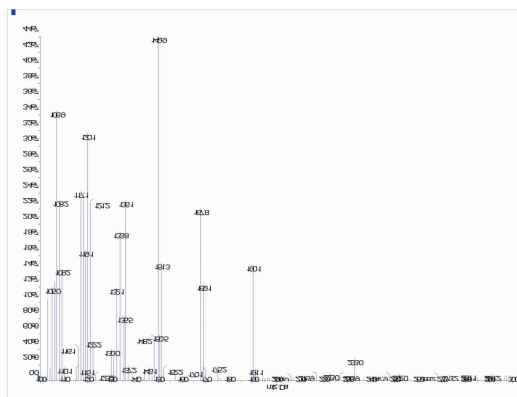


图 3 辛弗林质谱图

Fig. 3 The mass spectrum of synephrine

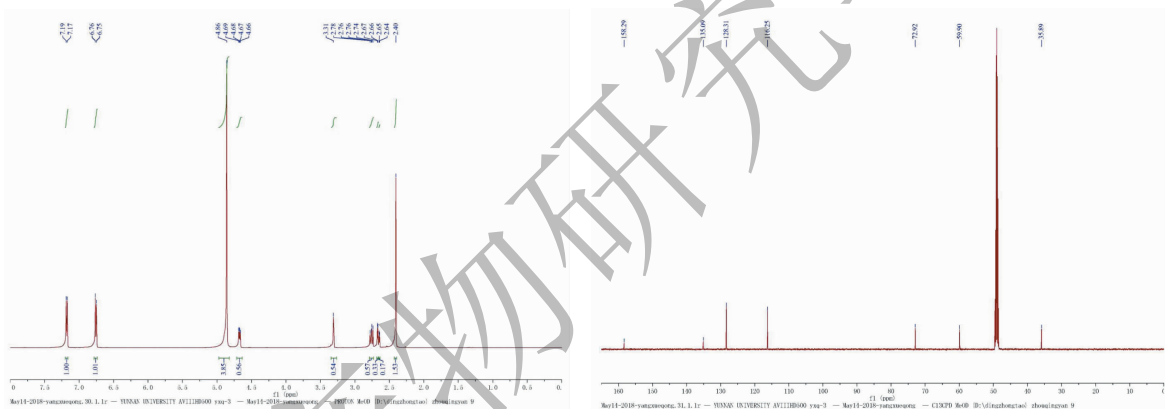


图 4 辛弗林核磁谱

Fig. 4 The nuclear magnetic spectrum of synephrine

林的纯度平均值为 99.77%,其标准偏差为 0.006 2%,组间方差  $S_1^2 = 0.003 27$ ,组内方差  $S_2^2 = 0.002 87$ , $F = \text{组间方差} / \text{组内方差} = 1.14$ ,因此, $F < F_{0.05}(19, 40) = 1.84$ ,表明辛弗林纯度标准物质的均匀性满足要求。

### 2.3 稳定性检验结果

利用趋势分析法对稳定性的结果进行考察,如图 5 所示。通过对数据进行 t 检验,根据判定公式,稳定性分析中所拟合的直线斜率绝对值应小于  $t_{(0.95, n-2)} \times \text{斜率的不确定度}$ ,结果如表 1 所示,短期稳定性和长期稳定性结果均符合要求。因此辛弗林标准样品在 6 个月内的稳定性较好,且模拟运输条件下的特性量值稳定。

### 2.1.4 核磁分析

通过对辛弗林的氢谱和碳谱分析,化学位移归属为: $^1\text{H NMR}$  (Methanol- $\text{D}_4$ , 600 MHz): $\delta$  2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); $\delta$  2.64 ~ 2.789 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); $\delta$  4.67 (dd, 1H;  $J = 6.0$ ;  $J = 6.0$ ,  $\text{CH-O}$ ); $\delta$  6.76 (d, 2H,  $J = 6.0$  Hz,  $\text{ArCH}$ ); $\delta$  7.19 (d, 2H,  $J = 12.0$  Hz,  $\text{ArCH}$ ); $^{13}\text{C NMR}$  (Methanol- $\text{D}_4$ , 150 MHz): $\delta$  35.9 ( $\text{CH}_3\text{-N}$ ); $\delta$  59.9 ( $\text{CH}_2\text{-N}$ ); $\delta$  72.9 ( $\text{CH-OH}$ ); $\delta$  116.2 ( $\text{ArCH}$ ); $\delta$  128.3 ( $\text{ArCH}$ ); $\delta$  135.1 ( $\text{ArC}_0$ ); $\delta$  158.3 ( $\text{ArCH-OH}$ )。与文献中辛弗林的氢谱和碳谱进行比较,其核磁数据与文献<sup>[22]</sup>一致,结合红外、紫外和质谱信息,可确定其为辛弗林。

### 2.2 均匀性检验结果

根据 GB/T 15000-2008《标准样品工作导则》中对标准样品进行均匀性检验的要求。通过面积归一化法对辛弗林纯度标准样品的纯度进行计算,辛弗

### 2.4.1 质量平衡法定值结果

(1)液相色谱-面积归一化法测定含量:采用优化后的色谱条件:色谱柱:资生堂  $\text{C}_{18}$  色谱柱, 5  $\mu\text{m}$ , 4.0  $\times$  250 mm;流动相为甲醇:水 (10:90),进样量:10  $\mu\text{L}$ ;流速:0.5 mL/min;柱温:30  $^\circ\text{C}$ ,检测波长 220 nm,辛弗林的液相色谱图如图 6 所示。

(2)采用卡尔费休库伦法测定了水分含量、顶空气相色谱法测定了挥发性杂质含量和 ICP-MS 测定了无机元素含量等,结果如表 2 所示,质量平衡法测定的纯度质量分数为 99.55%。

### 2.4 定值结果

#### 2.4.2 核磁定量法定值结果

根据尼泊金乙酯和辛弗林在氢谱中的化学位

表 1 辛弗林纯度的稳定性检验结果 (%)

Table 1 Test results of the stability of the purity of synephrine (%)

项目 Project	长期稳定性检验 Long-term stability test		短期稳定性检验 Short-term stability test		
	时间 Time (month)	检验结果 Test result	时间 Time (days)	检验结果 Test result (20 °C)	检验结果 Test result (40 °C)
	0	99.76	0	99.76	99.76
	1	99.77	3	99.77	99.76
	3	99.77	5	99.76	99.77
	6	99.76	7	99.75	99.76
	99.78			14	99.78
$\bar{Y}$	99.77	$\bar{Y}$	99.76	99.77	
$\bar{X}$	2.5	$\bar{X}$	5.8	5.8	
$b_1$	-0.000 12	$b_1$	0.001 12	0.001 41	
$b_0$	99.77	$b_0$	99.76	99.76	
$S^2$	0.000 093	$S^2$	0.000 206	0.000 062	
$S(b_1)$	0.002 1	$S(b_1)$	0.001 33	0.000 75	
$t_{(0.95, n-2)}$	4.30		3.18	3.18	
$u_{lts}$	0.009	$u_{sts}$	0.004	0.002	

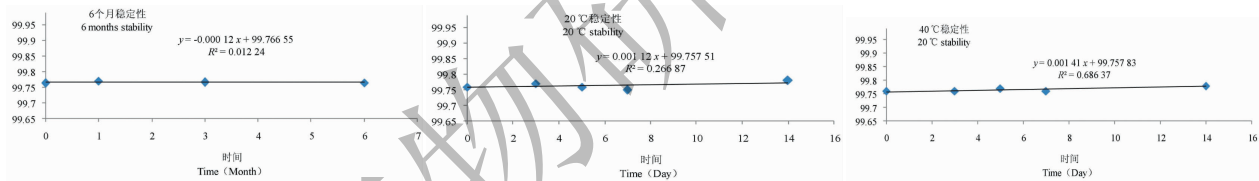


图 5 稳定性趋势分析图  
Fig. 5 Trend analysis of stability analysis

表 2 辛弗林面积归一法定值结果 (%)

Table 2 Confirmation of synephrine by area normalization (%)

编号 No.	主成分纯度 Principal component purity (%)	水分含量 Moisture content (%)	挥发性物质 Volatile matter (%)	无机非挥发性物质 Inorganic non-volatiles (%)	纯度定值 Purity value (%)
1	99.765	0.0542	-	0.174 6	99.545
2	99.778	0.0533	-	0.173 4	99.539
3	99.774	0.0551	-	0.172 4	99.569
4	99.768	0.0549	-	0.176 2	99.540
5	99.764	0.0547	-	0.173 7	99.555
6	99.773	0.0539	-	0.174 5	99.532
7	99.786	0.0542	-	0.171 4	99.544
平均值 Average	99.772	0.0544	-	0.173 7	99.546
标准偏差 Std Dev	0.007 8%	1.23%	-	10.670%	0.013 6%

移,选择了尼泊金乙酯化学位移 1.35 ppm 和辛弗林化学位移 2.45 ppm 处的氢作为定量的目标峰,7 次测定的结果分别为 99.689%、99.695%、99.689%、99.691%、99.693%、99.688% 和 99.690%,平均值为 99.691%,相对标准偏差为 0.002%。

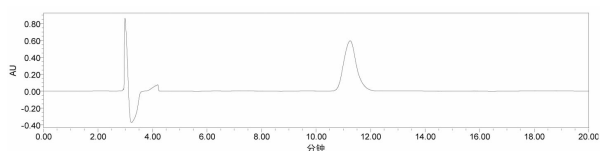


图 6 辛弗林液相色谱图

Fig. 7 Liquid chromatogram of synephrine

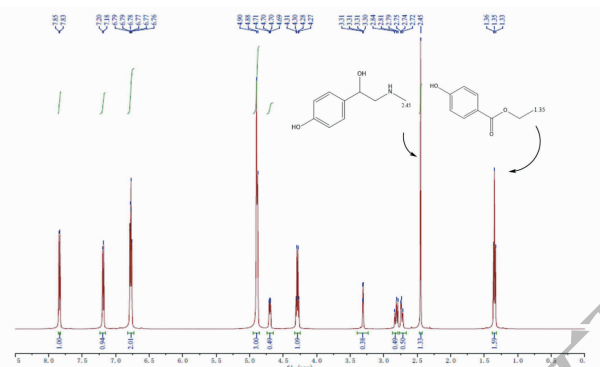


图 7 辛弗林定量核磁氢谱

Fig. 7 Quantitation <sup>1</sup>H-NMR of synephrine

#### 2.4.3 两种方法定值结果

根据质量平衡法和核磁定量法的定值结果分别为 99.546% 和 99.691%,可以得到最终的定值结果为  $(99.546\% + 99.691\%) / 2 = 99.618\%$ 。

### 2.5 不确定度评定结果

2.5.1 不均匀引入的不确定度  $u_{bb} = \sqrt{\frac{S_1^2 - S_2^2}{n}}$ ,根据以上均匀性检验得到的数据计算:组间方差  $S_1^2 = 0.000327$ ,组内方差  $S_2^2 = 0.000287$ ,  $S_H^2 = (S_1^2 - S_2^2) / n = 0.000013$ ,  $S_H = 0.0036$ ,  $S_2 = 0.0169$ ,因为不均

匀性所产生的标准偏差  $S_H$  与方法测量的标准偏差  $S_2$  大小相近,这时作为标准样品总的不确定度需要把均匀性因素考虑进去。不均匀引入的不确定度为:  $\mu_{bb} = S_H = 0.36\%$ 。

$$u(M_{C_9H_{13}NO_2}) = \sqrt{(9 \times 0.0008)^2 + (13 \times 0.00007)^2 + (2 \times 0.0003)^2 + (0.0002)^2} = 0.0073,$$

与其分子量相比,远小于 0.1%,故  $\frac{u(m_x)}{m_x}$  可忽略不计,同理  $\frac{u(m_{std})}{m_{std}}$  也忽略不计;天平的精度为 0.1  $\mu\text{g}$ ,样品称取量为 5 mg 左右,天平称量的不确定度远小于 0.1%,可忽略不计;由尼泊金乙酯的标物证书得

到其不确定度为 0.2%,故  $\frac{u(P_{std})}{P_{std}} = 0.2/99.7 = 0.2006\%$ 。因此,根据核磁定量法的不确定度计算公式,可得  $u_{NMR} = 0.199\%$ 。

2.5.2 不稳定引入的不确定度:根据表 1 的结果,辛弗林纯度标准样品长期稳定性引入的不确定度为  $u_{ls} = 0.009\%$ ,辛弗林纯度标准样品短期稳定性引入的不确定度分别为 20  $^{\circ}\text{C}$  的  $u_{sts,20^{\circ}\text{C}} = 0.004\%$  和 40  $^{\circ}\text{C}$  的  $u_{sts,40^{\circ}\text{C}} = 0.002\%$ ,短期稳定性引入的总的不确定度为  $u_{sts} = 0.0045\%$ 。

2.5.3 液相色谱法定性的测量重复性引入的不确定度  $u_1$ ,由测量的相对标准偏差计算为 0.0078%;杂质在不同检测波长下响应差异引入的不确定度  $u_2$ ,本研究中的辛弗林中的杂质的最大吸收波长与主成分一致,可将  $u_2$  忽略不计;仪器检测线性引入的不确定度  $u_3$ ,本研究中辛弗林在 0.05 ~ 500.00 mg/L 的浓度范围内线性良好(相关系数为 0.9995),可将  $u_3$  忽略不计;仪器检出限引入的不确定度  $u_4$ ,通过试验可以得到仪器的检出限为 0.40 mg/L,  $u_4 = 0.40/500.00 = 0.08\%$ 。

2.5.4 水分测量引入的不确定度  $u_{Xw}$ ,由计算公式

$$\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X - \bar{X})^2} \text{ 计算可得 } u_{Xw} = 0.062\%; \text{ 非挥发性}$$

杂质测量测量引入的不确定度  $u_{Xn}$ ,由计算公式

$$\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (X - \bar{X})^2} \text{ 计算可得 } u_{Xn} = 0.14\%; \text{ 挥发性杂质}$$

测量测量引入的不确定度  $u_{Xv}$ ,由于本实验的辛弗林中挥发性杂质很少,可忽略不计。

2.5.5 根据质量平衡法的不确定度  $u_{MB}$  的计算公式,可计算得到  $u_{MB} = 0.17\%$ 。

2.5.6 定量峰面积的不确定度  $u(I_x/I_{std})$ ,可由多次测量的相对偏差得到为 0.002%,  $\frac{u(I_x/I_{std})}{I_x/I_{std}} = 0.002\% / 0.836 = 0.0024\%$ ;辛弗林中各元素原子量的不确定度

到其不确定度为 0.2%,故  $\frac{u(P_{std})}{P_{std}} = 0.2/99.7 = 0.2006\%$ 。因此,根据核磁定量法的不确定度计算公式,可得  $u_{NMR} = 0.199\%$ 。

$$2.5.7 \quad u_{char} = \frac{\sqrt{u_{MB}^2 + u_{NMR}^2}}{2}, \text{ 可计算得到 } u_{char} =$$

0.13%; 根据不确定度的计算公式  $u_{\text{CRM}} = \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{lis}}^2 + u_{\text{sts}}^2} = 0.4\%$ , 其扩展不确定度为  $U = 2 \times u_{\text{CRM}} = 0.8\%$  ( $k = 2$ )。

### 3 结论

本研究采用大孔树脂及制备色谱等现代分离纯化手段, 从枳实中分离得到辛弗林, 采用质量平衡法和定量核磁法两种不同原理的定值方法对辛弗林进行定值以及均匀性、稳定性和不确定度研究, 辛弗林标准样品的定值结果为 99.62%, 其扩展不确定度为 0.8% ( $k = 2$ ), 满足国家标准样品的要求, 对于相关样品中辛弗林的测定具有重要意义。

### 参考文献

- Zhang XX, Li ZY, Ma YL, et al. Progress in research of traditional Chinese medicine *Citrus aurantium* [J]. China J Chin Mater Medica (中国中药杂志), 2015, 40:185-190.
- Zhang WJ, Tao Y, Wang YJ, et al. Research progress in biological activity of p-synephrine in citrus fruits [J]. Sci Technol Food Ind (食品工业科技), 2013, 34:331-334.
- Bakhya N, Dusemund B, Richter K, et al. Risk assessment of synephrine in dietary supplements [J]. Bundesgesundheitsbla, 2017, 60:323-331.
- Rossato LG, Costa VM, Limberger RP, et al. Synephrine: from trace concentrations to massive consumption in weight-loss [J]. Food & Chem Toxicol, 2011, 49(1):8-16.
- Yan H, Ding ZE, Dong M, et al. Effects of synephrine from citrus peel on weight losing of nutritional pinelosis rats [J]. J Food Sci Biotechnol (食品与生物技术学报), 2017, 36:890-895.
- Zhang WJ, Pan LG, Tao Y, et al. Optimization of ultrasound assisted extraction technology for synephrine from young fruits of citrus poonensis hort. ex tanaka by response surface methodology [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2015, 15(9):91-99.
- Zhao KJ, Zhen YZ, Dong TX, et al. Analysis of HPLC fingerprints of fructus aurantii from different habitats and contents of naringin, neohesperidin and synephrine [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2011, 46:955-959.
- Lei JW, Fan MY, Bai Y, et al. Determination of Citrus aurantium based on near-infrared spectroscopy [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2015, 27:1199-1204.
- Liu MQ, Kong ML, Liu ZY, et al. Optimization of cell wall breakdown by vacuum air current technique for synephrine extraction from abscising fruits of citrus tankan using response surface methodology [J]. Food Sci (食品科学), 2016, 37(8):74-80.
- Zhang L, Fan JP, Cao J, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction process for synephrine from citrus aurantium fruit by response surface methodology [J]. Food Sci (食品科学), 2011, 32(14):1-5.
- Hu J, Liao ML, Wei W, et al. Determination of simphine in tamping by solid phase extraction-HPLC [J]. China J Chin Mater Medica (中国中药杂志), 2010, 35:736-738.
- Yang H, Guo YM, Tan ZY, et al. Determination of synephrine, arecoline and norisoboldine in simotang dropping pills by HPLC [J]. Guiding J Traditional Chin-Med Pharm (中医药导报), 2016, 22(2):40-43.
- Tang F, Tao L, Luo X, et al. Determination of octopamine, synephrine and tyramine in Citrus herbs by ionic liquid improved 'green' chromatography [J]. J Chromatogr A, 2006, 1125:182-188.
- Niemann RA, Gay ML. Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection [J]. J Agric Food Chem, 2003, 51:5630-5638.
- Pellati F, Benvenuti S, Melegari M, et al. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. *amara* by LC [J]. J Pharm Biomed Anal, 2002, 29:1113-1119.
- Yuan GJ, Li PB. Separation of synephrine from Citrus aurantium with macroporous adsorption resin [J]. Ion Exch Adsorpt (离子交换与吸附), 2010, 26:415-423.
- Liu BM, Huang RS, Huang Y, et al. Study on the preparation and analysis of candidate reference substance of Karanjin [J]. Drug Standards of Chin (中国药品标准), 2016, 17:103-106.
- Gu XF, Wang HF, Liu BJ, et al. Evaluation of uncertainty in measurement of moisture by Karl Fischer Coulomb method and volumetric method [J]. Chin Metrology (中国计量), 2014, 12:76-80.
- Lv S, Wei HZ, Rao Y, et al. Determination of four kinds of organic volatile impurities in different officinal accessories by static headspace gas chromatography [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2015, 35:2012-2017.
- Zhang L, Guo Y, Zhou Z, et al. Purity determination and uncertainty evaluation of a new certified reference material of Pinoembrin [J]. Anal Methods, 2014, 6:2699-2703.
- Chen Y, Zhang H, Deng C. Purity determination and uncertainty evaluation of hydrocortisone acetate reference material [J]. Chem Reagents (化学试剂), 2018, 40:261-268.
- Andrade AS, Schmitt GC, Rossato LG, et al. Gas chromatographic method for analysis of p-synephrine in Citrus aurantium L. products [J]. Chromatogr, 2009, 69:225-229.