

· 专题 ·

基于 UPLC 的苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的
不确定度研究[△]郭晓晗¹, 丁一明^{1,2}, 张宇^{1,3}, 荆文光¹, 李明华¹, 康帅¹, 程显隆^{1*}, 魏锋^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029;

3. 沈阳药科大学 功能食品与葡萄酒学院, 辽宁 沈阳 117004

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱法 (UPLC) 测定苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的不确定度。方法: 通过分析样品前处理、测试过程, 确定并简化影响不确定度的因素; 利用 UPLC 测定苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的方法学验证数据及样品代表性试验数据, 通过统计学方法量化不确定度分量; 计算合成不确定度和扩展不确定度。结果: 建立了 UPLC 测定苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的不确定度评定方法, 当置信概率为 95%、包含因子 (k) = 2 时, 其相应的扩展不确定度为 16.19%。苏合香中的水分、误差引入的不确定度分量为合成不确定度的主要贡献量, 而对照品纯度的影响最小。应注意样品保存的环境及仪器、量器的定期检定和维护等, 以减小测量结果的不确定度。结论: 研究结果为提高检测质量提供理论指导, 为苏合香的质量控制提供科学依据。

[关键词] 苏合香; 测量不确定度; 超高效液相色谱法; 肉桂酸-3-苯基丙酯; 扩展不确定度

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2025)03-0426-06

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20240730005

Evaluation of Uncertainty in Measurement of 3-Phenylpropyl Cinnamate in Styra by UPLC

GUO Xiaohan¹, DING Yiming^{1,2}, ZHANG Yu^{1,3}, JING Wenguang¹, LI Minghua¹, KANG Shuai¹,
CHENG Xianlong^{1*}, WEI Feng^{1*}

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China;

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Faculty of Functional Food and Wine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 117004, China

[Abstract] **Objective:** To evaluate the uncertainty in the measurement of 3-phenylpropyl cinnamate in Styra by ultra-performance liquid chromatography (UPLC). **Methods:** The factors affecting the uncertainty were identified and simplified by analyzing the sample pretreatment and measurement processes. The uncertainty components were quantified by statistical methods with the validation data of the UPLC method for measuring 3-phenylpropyl cinnamate in Styra and the representative test data of the samples. The combined uncertainty and expanded uncertainty were calculated. **Results:** A method was established for evaluating the uncertainty in the measurement of 3-phenylpropyl cinnamate in Styra by UPLC. The expanded uncertainty was 16.19% in the case of the confidence probability being 95% and the coverage factor $k=2$. The uncertainty components introduced by water and error in Styra were the main contributors to the combined uncertainty, while the purity of the reference material had the least effect. Attention should be paid to the environment of sample preservation as well as the regular calibration and maintenance of instruments and gauges to minimize the uncertainty of the measurement results. **Conclusion:** The results provide theoretical guidance to improve the measurement quality and a scientific basis for the quality control of Styra.

[Keywords] Styra; measurement uncertainty; ultra-performance liquid chromatography (UPLC); 3-phenylpropyl cinnamate; expanded uncertainty

[△] **[基金项目]** 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金项目 (2023A2)

^{*} **[通信作者]** 魏锋, 研究员, 研究方向: 中药质量控制; Tel: 010-53852020, E-mail: weifeng@nifdc.org.cn
程显隆, 研究员, 研究方向: 中药质量控制; Tel: 010-53851475, E-mail: cxl@nifdc.org.cn

测量不确定度作为测量结果的一部分,合理表征了被测量值的分散性,对测量结果的可信性、可比性和可接受性都有重要影响,是评价测量质量的重要指标^[1]。测量不确定度是对测量结果质量的定量表征,测量结果的可信度和可用性很大程度上取决于其不确定度的大小^[2-6]。不确定度越小,测量结果的质量越高,可信度和可用性越大。所以,附有测量不确定度说明的测量结果数据才是完整并有意义的。现今中药的标准化、国际化发展趋势明显,测量不确定度在中药质量分析中的应用日益广泛且备受重视^[7-11]。正确表述和评定测量方法的测量不确定度将逐步成为国际通行的要求。对特定成分进行含量测定时,进行科学合理的不确定度评估才能满足中药标准国际交流合作要求^[12]。

苏合香(*Styrax*)是著名的进口树脂类药材,为金缕梅科植物苏合香树 *Liquidambar orientalis* Mill. 树干渗出的香树脂经加工精制而成,为半流动性的浓稠液体,具有开窍、辟秽、止痛的功效^[13]。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版规定其含量测定项以总肉桂酸为测定指标^[13]。为提升药品质量,建立科学、有效、专属的质量控制方法,本课题组开展苏合香质量标准研究。苏合香大多由芳香族化合物和萜类化合物组成,芳香族化合物主要为肉桂酸及其酯类,肉桂酸酯及其衍生物是一类具有C6-C3结构单元的苯丙素类化合物,广泛存在于植物中,该类化合物具有抗癌、杀虫、抗菌、抗氧化、抗病毒和肝保护等多种生物活性^[14-16]。肉桂酸-3-苯基丙酯是苏合香的主要成分之一,同时也是苏合香的专属性成分,质量分数为15%以上,有必要将其作为苏合香含量测定的指标之一。因此,本研究建立了超高效液相色谱-紫外检测器法(UPLC-UV)测定苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的质量控制方法。

根据《化学分析中不确定度的评估指南》(CNAS-GL006:2019)^[17]的有关规定,本研究对苏合香药材中肉桂酸-3-苯基丙酯的UPLC定量方法进行测量不确定度评定,分析整个前处理及测定过程,通过评价该成分测定过程的测量不确定度,探讨各不确定度分量对测定结果的影响。在准确度要求比较高的情况下,使用扩展不确定度来评价结果的准确度和真实性,所以本研究探讨苏合香定量方法中各不确定度分量对测定的扩展不确定度的影响,为

评估苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯定量测定结果提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Acquity H-Class型超高效液相色谱仪(美国沃特世公司);KQ-500DE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);XS205DU型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器公司)。

1.2 试药

对照品肉桂酸-3-苯基丙酯(批号:1ST005037,纯度≥98%,天津阿尔塔科技有限公司);乙腈为色谱纯(英国赛默飞世尔科技有限公司);冰乙酸、乙酸乙酯、无水乙醇均为分析纯,均购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水(实验室自制)。

1.3 样品

共收集10批苏合香样品,由中国食品药品检定研究院魏锋研究员鉴定为金缕梅科植物苏合香树 *Liquidambar orientalis* Mill. 树干渗出的香树脂经加工精制而成的苏合香,编号为S1~S10。其中S1~S5收集自河北安国,S6~S10收集自安徽亳州;均为半流动性的浓稠液体,颜色为暗棕色至棕黄色。

2 方法与结果

对苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯的UPLC定量方法的测量不确定度的评定,可以通过分析测量过程、分析不确定度来源、量化不确定度分量、计算合成不确定度及扩展不确定度这四部分来完成。

2.1 测量过程

2.1.1 色谱条件 采用Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱,流动相为1%冰乙酸(A)-乙腈(B);梯度洗脱(0~5 min, 80%~75%A; 5~10 min, 75%~45%A; 10~16 min, 45%~42%A; 16~20 min, 42%~35%A);柱温为35℃;流速为0.3 mL·min⁻¹;检测波长为277 nm;进样量为1 μL。

2.1.2 供试品溶液的制备 称取苏合香约0.5 g,精密称定,置于锥形瓶中,加入乙酸乙酯40 mL,超声30 min至完全溶解,放冷,将溶液转移至50 mL量瓶中,用乙酸乙酯定容至刻度。精密吸取1 mL至

25 mL量瓶中,用无水乙醇定容至刻度,摇匀,通过0.22 μm滤膜滤过,即得。

2.1.3 对照品储备溶液的制备 称取对照品肉桂酸-3-苯基丙酯29 mg,精密称定,置于25 mL量瓶中,用无水乙醇溶解并定容,制成对照品储备溶液。

2.1.4 方法学考察 取2.1.3项下对照品储备溶液,按照倍半稀释法连续稀释至对应5个质量浓度,按2.1.1项下色谱条件进样,以对照品质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)作线性回归分析,得线性方程 $Y=14\,786X+4\,686.6$ ($r=0.999\,8$),当肉桂酸-3-苯基丙酯质量浓度为23.54~470.72 mg·L⁻¹时,其与峰面积呈现良好的线性关系。取苏合香样品(S3)0.5 g,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件连续进样,重复进样6次考察仪器精密度,肉桂酸-3-苯基丙酯峰面积的RSD为0.15%,表明仪器的精密度良好。在供试品溶液(S3)制备后0、2、4、8、12、24 h进样测定考察稳定性,肉桂酸-3-苯基丙酯峰面积的RSD为2.0%,表明供试品溶液(S3)在24 h内稳定。平行制备6份供试品溶液并进样,肉桂酸-3-苯基丙酯的平均质量分数为20.5% (RSD为0.44%),重复性符合要求。根据重复性的结果,取S3苏合香样品0.5 g,精密称定,加入样品含量100%的肉桂酸-3-苯基丙酯对照品溶液,平行制样6份考察加样回收率,结果显示肉桂酸-3-苯基丙酯的平均回收率为99.2%,RSD为1.8%,表明该方法准确度良好^[18]。

2.1.5 含量测定分析 根据苏合香样品的提取和分析测试过程,按公式(1)计算苏合香样品中肉桂酸-3-苯基丙酯的质量分数。

$$C = \frac{A \times D \times V}{W \times (1 - C_w)} \quad (1)$$

式中, C 为苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯的质量分数(mg·kg⁻¹); A 为样品溶液中被分析成分的质量浓度(mg·L⁻¹); V 为样品溶液的最终体积(mL); W 为药材的称样量(g); D 为稀释因子(如果溶液中组分质量浓度超出标准曲线范围,溶液需要稀释的倍数); C_w 为药材中的水分含量(%)。

若样品不均匀,在计算公式中加入样品均匀性因子 $[F(\text{Hom})]$ 项,将计算公式(1)修正为公式(2)。

$$C = \frac{A \times D \times V \times F(\text{Hom})}{W \times (1 - C_w)} \quad (2)$$

2.2 确定和分析不确定度来源

首先确定可能产生不确定度的所有来源。例如在样品制备过程中,样品的称量、对照品的称量和称量用的分析天平的误差带来的不确定度,样品中基质干扰或共存组分带来的影响等。根据2.1项下的测量过程分析不确定度来源。

样品制备过程中涉及分析天平和不同的体积计量装置(量瓶、移液管等)的使用,分析天平和容器校准的影响处于常规控制之下,其不确定性可以忽略不计。回收率研究还包括环境温度对结果的影响。在方法学验证过程中,确定了在给定质量浓度范围内肉桂酸-3-苯基丙酯的线性响应。对测定过程涉及因素进行简化,首先,精密度涵括了所有参数的精密度引起的不确定度(包括 A 、 W 、 V 、 D);其次,回收率的测定及误差分析可评定由样品基质、其他组分干扰等诸多因素带来的不确定度;其他如样品均匀性、含水量[水分含量的转换因子 $F(C_w)$]、对照品含量(纯度)等,也应分别予以考察。因此,UPLC测定苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量的测量不确定度来源分析见图1。

2.3 量化测量不确定度分量

2.3.1 精密度研究 为获得单次测定的相对标准不确定度估计值,将2.1.4项下精密度的6次数据的标准偏差除以 $\sqrt{2}$ 来校正10批样品含量测定平行数据差异的标准偏差。

肉桂酸-3-苯基丙酯的含量测量结果及相对不确定度见表1。

2.3.2 误差研究 通过方法学验证中的加样回收率数据计算误差,回收率越接近于1,方法误差越小。回收率标准不确定度按加样回收率平均值的标准偏差计算,其不确定度按公式(3)进行计算。

$$u(\text{Rec}) = \text{SD} / \sqrt{n} \quad (3)$$

式中, $u(\text{Rec})$ 为回收率标准不确定度,SD为标准偏差, n 为测量次数。结果为0.007 8。

同时,为校正明显的系统误差,在误差分析中需要进行 t 检验, t 值按公式(4)计算。

$$t = \frac{|1 - \text{Rec}|}{u(\text{Rec})} \quad (4)$$

其中,Rec为平均回收率(99.24%)。该 t 值与双尾临界值 $t_{\text{crit}-1}$ (自由度为 $n-1$,95%置信水平)比较,如果 t 值低于临界值 $t_{\text{crit}-1}$,按公式(3)计算

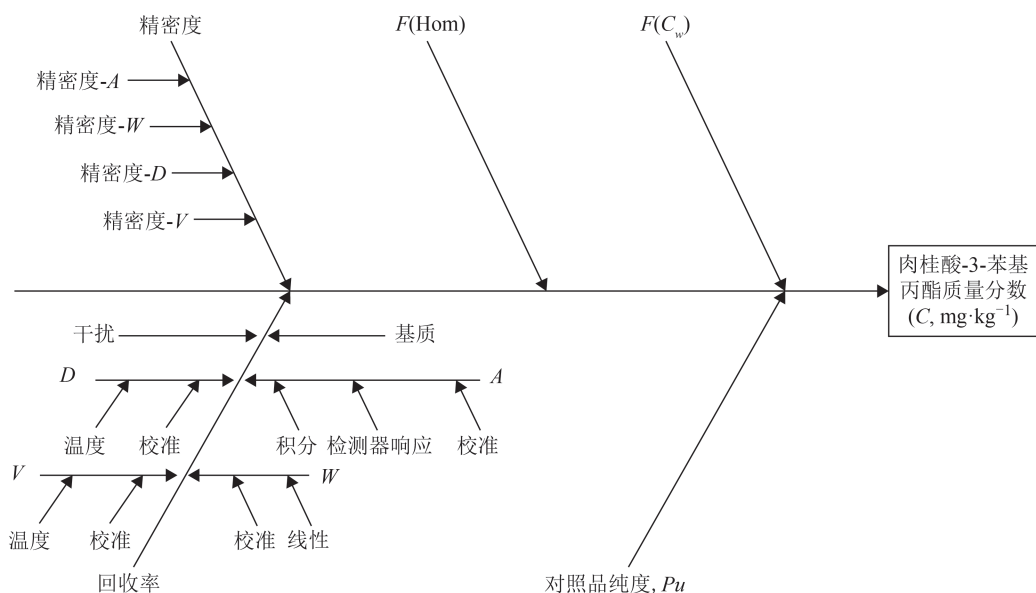


图1 UPLC定量方法测量苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯的不确定度来源

表1 10批苏合香样品中肉桂酸-3-苯基丙酯质量分数平行测定结果及相对不确定度的精密度研究结果

编号	质量分数1/mg·kg ⁻¹	质量分数2/mg·kg ⁻¹	平均质量分数/mg·kg ⁻¹	绝对偏差/mg·kg ⁻¹	相对偏差
S1	202 797.17	203 343.06	203 070.11	545.89	0.002 7
S2	170 195.80	169 743.49	169 969.64	452.31	0.002 7
S3	169 497.74	169 960.47	169 729.10	462.73	0.002 7
S4	171 742.60	171 572.70	171 572.70	169.90	0.001 0
S5	194 235.02	188 502.16	191 368.59	5 732.86	0.030 0
S6	167 564.32	170 275.27	168 919.80	2 710.95	0.016 0
S7	209 233.05	210 294.52	209 763.79	1 061.47	0.005 1
S8	176 307.43	176 393.68	176 350.56	86.25	0.000 5
S9	173 976.01	172 955.72	173 465.87	1 020.29	0.005 9
S10	173 810.00	172 167.67	172 988.83	1 642.33	0.009 5
SD					0.009 1
$u(Pr)/P$					0.006 5

注: Pr 表示精密度; $u(Pr)/P$ 表示相对不确定度。

所得回收率标准不确定度; 如果 t 值高于临界值 $t_{\text{critin}-1}$, 则表明差异有统计学意义。如果测试结果未进行回收率校正, 则必须增加不确定度, 以考虑回收率未校正这一事实。按公式(5)对不确定度进行校正。

$$u(\text{Rec})'' = \sqrt{\left(\frac{1 - \text{Rec}}{k}\right)^2 + u(\text{Rec})^2} \quad (5)$$

式中, $u(\text{Rec})''$ 表示在 95% 置信水平下, 包含因子 (k) = 2 时的回收率标准不确定度, 结果为 0.008 7。

2.3.3 其他来源的不确定度 对照品的纯度通常由对照品供应商提供, 其不确定度可用矩形分布假设

来计算, 见公式(6)。

$$u(Pu) = \frac{(1 - \text{Purity})}{2} \times \frac{1}{\sqrt{3}} \quad (6)$$

其中, $u(Pu)$ 为对照品纯度引起的不确定度, Purity 为对照品的最低纯度。

肉桂酸-3-苯基丙酯对照品的标示纯度不低于 98%, 因此, 纯度引起的不确定度为 0.005 8。

苏合香为半流动匀质黏稠液体, 因此均匀性对分析过程不确定度的贡献可以忽略。根据苏合香药材的特性, 采用甲苯法测定苏合香药材中的含水量, 通过转换因子 $F(C_w)$ 计算水分含量引起的标准不确定度。

采用甲苯法测定苏合香药材中的含水量,肉桂酸-3-苯基丙酯的含量需按干燥品计算,引起的标准不确定度为0.08。

2.4 计算合成不确定度及扩展不确定度

在对分析程序进行内部验证研究期间,对精密度、误差等进行调查。按公式(7)计算合成不确定度。

$$u_c(C) = \frac{\sqrt{u(Pr)^2 + u(Rec)^2 + u(Pu)^2 + u(C_w)^2}}{C} \quad (7)$$

其中, Pr 表示精密度, $u(Pr)$ 表示标准不确定度; C 是苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯的质量分数 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); $u_c(C)$ 是苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯的含量的合成不确定度, 结果为0.0809。

由公式(8)计算95%置信度下苏合香药材中分析物的扩展不确定度。

$$U(C) = k \times u_c(C) \quad (8)$$

在置信水平为95%时, $k=2$, 结果为0.1619。

3 讨论

测量的不确定度在分析化学领域具有非常重要的意义, 是评价实验结果可信赖程度的指标。为了增加实验结果的可比性, 需要将其更加广泛地应用到分析实验中, 也是标准建立与推广应用不可或缺的内容。本研究通过分析测量过程、分析不确定度来源、量化不确定度分量、计算合成不确定度及扩展不确定度这4部分来评价苏合香中肉桂酸-3-苯基丙酯含量测定方法的不确定度, 评估该含量测定方法的可信度, 使得测定结果更有意义和说服力。

首先, 在不确定度的评定中, 精密度(包括 A 、 W 、 V 、 D)造成的不确定度为0.0065, 因此要加强对样品的称样量、稀释过程、分析天平 and 不同的体积计量装置的校准计量的关注, 取样量及所使用的分析天平的精度影响不确定度的大小, 因此, 应根据天平的量程及样品本身的特点, 选择合适的称量器皿、增大称样量; 及时请专业的计量人员对天平进行计量并校准, 减少此类因素对不确定度的影响。其次, 回收率的测定及误差引起的不确定度为0.0087, 是不确定度的重要因素。此部分主要是样品基质、其他组分干扰、温度、检测器的响应等诸

多因素带来的不确定度。因此, 结合苏合香药材属于挥发性树脂药材, 注意控制实验室温湿度、样品的储存条件及色谱柱柱温等, 减少影响; 并且要定期维护超高效液相色谱仪, 使其保持较高的灵敏度, 减少误差, 提高检测准确性。此外, 对照品的纯度影响最小; 而样品中的水分含量对测定结果的影响最大, 这与苏合香药材的收集及储存相关。因此需要注意苏合香样品放置环境的控制, 以及苏合香中水分测定的准确性, 由于苏合香中含有大量的挥发性成分, 因此, 在做含量测定前, 需要采用甲苯法对苏合香的水分进行测定, 以降低含量测定的不确定度。

不确定度的信息是定量分析的重要组成部分, 可用于评估定量方法的可靠性和测量结果的可信程度。国家法定标准中的中药特定成分的含量测定应加强不确定度的分析和测定, 以增强该标准的公信力。本研究也为中药中含量测定指标的检测结果判断与不确定度分析提供参考。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. 测量不确定度的要求: CNAS-CL01-G003—2021[S]. 北京: 国计量出版社, 2023.
- [2] 李纯, 黄志星, 栗建明, 等. LC-MS/MS测定菊花中氟虫腈残留量的不确定度评定[J]. 中国现代中药, 2023, 25(5): 964-968.
- [3] 毛乐静, 霍仕霞, 孔征, 等. HPLC测定毛蕊花糖苷原料药含量的不确定度评估[J]. 中国现代中药, 2018, 20(12): 1515-1520.
- [4] 马晓静, 崔业波, 高楠楠. 八珍益母丸中芍药苷的HPLC法测定结果的不确定度评价[J]. 中国现代中药, 2017, 19(12): 1754-1757.
- [5] 李菁, 康帅, 王冰, 等. 蒙特卡洛法和不确定度传播率法在药品内标法含量测定不确定度评定中的比较研究[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(6): 472-477.
- [6] 国家质量监督检验检疫总局. 电子天平检定规程: JJG 1036—2008[S]. 北京: 中国质检出版社, 2008.
- [7] 肖亭, 王晨, 姚尚辰, 等. 测量结果不确定度评定在我国药物分析领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1851-1859.
- [8] 魏惠珍, 谢菲, 饶毅, 等. HPLC法测定元胡止痛胶囊中延胡索乙素及其不确定度评定[J]. 中草药, 2012, 43(2): 299-302.
- [9] 胡坪, 罗国安, 赵中振, 等. 中药材定量分析中测量不确

- 定度的评定方法及其影响因素的研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 455-460.
- [10] 严华, 张萍, 鲁静, 等. HPLC法测定科蒂胶囊中腺苷含量的不确定度评估[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(6): 979-983.
- [11] 刘永利, 李冬梅, 冯丽, 等. 复方丹参片含量测定的不确定度分析[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1800-1802.
- [12] 陆明, 范国荣, 汪杨, 等. 测量不确定度在药品领域的应用[J]. 医药导报, 2013, 32(8): 1053-1057.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 172.
- [14] 陈栋栋. 肉桂酸酯及其衍生物的杀螨和抗菌活性及构效关系[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [15] 梁盛年, 段志芳, 付莉, 等. 几种肉桂酸衍生物与肉桂酸的抑菌作用比较研究[J]. 食品科技, 2005(9): 71-73.
- [16] 周琨. 肉桂酸酯类化合物的合成、抗植物病原真菌活性及构效关系[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [17] 中国合格评定国家认可委员会. 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS-GL006: 2019[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019.
- [18] 郭晓晗, 丁一明, 张宇, 等. 不同产地苏合香超高效液相色谱特征图谱及多指标成分含量测定[J]. 药物分析杂志, 2025, 45(1): 72-80.

(收稿日期: 2024-07-30 编辑: 吴美琪)