

热炎宁合剂中单咖啡酰酒石酸的含量测定 高效液相色谱法

参考——《中国药典（2025 年版）》

一、背景

热炎宁合剂由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲 4 味药组成，具有清热解毒的功效，用于外感风热内郁化火所致风热感冒、发热、咽喉肿痛、口苦咽干、咳嗽痰黄、尿黄便结、化脓性扁桃体炎、急性咽炎、急性支气管炎、单纯性肺炎见上述证候者。现代研究证明，热炎宁合剂在治疗小儿急性上呼吸道感染及扁桃体发炎时疗效显著。

热炎宁合剂收载于《中国药典（2020 年版）》一部，质量标准仅有大黄素和虎杖苷含量的限度检测，在《中国药典（2025 年版）》中，新增蒲公英和北败酱中单咖啡酰酒石酸 HPLC 含量测定，限度为 0.40mg/mL。

二、实验过程

1 试剂与材料

- 1.1 水：符合 GB/T 6682 的一级水；
- 1.2 乙腈：色谱纯；
- 1.3 甲醇：色谱纯；
- 1.4 磷酸：分析纯；
- 1.5 0.2 %磷酸水溶液：准确量取 2 mL 磷酸（1.4），用水（1.1）稀释并定容到 1000 mL，混匀，过滤，超声后备用；
- 1.6 50 %甲醇水溶液：移取 50 mL 甲醇（1.3）和 50 mL 水（1.1），混匀，超声后备用；
- 1.7 80 %甲醇水溶液：移取 80 mL 甲醇（1.3）和 20 mL 水（1.1），混匀，超声后备用；
- 1.8 90 %甲醇水溶液：移取 90 mL 甲醇（1.3）和 10 mL 水（1.1），混匀，超声后备用；
- 1.9 单咖啡酰酒石酸对照品：CAS 号为 67879-58-7，纯度为 99.78 %；
- 1.10 市售热炎宁合剂。

2 仪器与设备

- 2.1 高效液相色谱仪：K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 C0 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站；

- 2.2 分析天平: 精确到 0.0001 g;
- 2.3 涡旋振荡器;
- 2.4 超声波清洗机;
- 2.5 抽滤装置;
- 2.6 容量瓶: 50 mL、1000mL, 棕色带刻度;
- 2.7 移液器: 200 μ L、1000 μ L;
- 2.8 一次性针头注射器;
- 2.9 微孔滤膜: 0.22 μ m, 有机相。

3 测定步骤

3.1 单咖啡酰酒石酸标准储备液的配制

称取单咖啡酰酒石酸对照品 (1.9) 适量, 精密称定, 用 50 %甲醇水溶液 (1.6) 配制
成每 1 mL 含单咖啡酰酒石酸 1 mg 的标准储备液, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存。

3.2 单咖啡酰酒石酸系列标准工作液的配制

分别准确吸取上述单咖啡酰酒石酸标准储备液 (3.1), 用 50 %甲醇水溶液 (1.6) 逐
级稀释, 配制成单咖啡酰酒石酸浓度依次为 1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、25 μ g/mL、
50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL 的系列标准工作液。其中单咖啡酰酒石酸浓度为 10 μ
g/mL 的标准溶液为对照品溶液。

3.3 空白溶液及灵敏度溶液的配制

空白溶液: 80 %甲醇水溶液 (1.7);

将单咖啡酰酒石酸对照品溶液稀释成浓度为 0.1 μ g/mL 的灵敏度溶液。

3.4 供试品溶液的制备

精密量取市售热炎宁合剂 (1.10) 5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 用水 (1.1) 稀释并定
容至刻度, 摇匀; 精密量取 5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 用 80 %甲醇水溶液 (1.7) 稀释
并定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

3.5 供试品加标溶液的制备

精密量取市售热炎宁合剂 (1.10) 5 mL, 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 单咖啡酰酒
石酸标准储备液 (3.1), 后续步骤同 3.4, 即得供试品加标溶液。

3.6 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，4.6×250 mm，5 μm 或者相当的色谱柱；
- b) 流动相：流动相 A 为乙腈（1.2），流动相 B 为 0.2 %磷酸水溶液（1.5），梯度洗脱表如下所示：

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	8	92
30	11	89
35	90	10

注：按照此梯度洗脱表运行，存在系统压力无法回归到进样前，基线不稳的情况，故设置每次进样前平衡 10 min。

- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 进样量：5 μL；
- e) 洗针液：90 %甲醇水溶液；
- f) 柱温：30 °C；
- g) 检测器及检测波长：检测器为紫外-可见光检测器，检测波长为 330 nm。

4 结果

4.1 重复性测试

按照色谱条件（3.6），对对照品溶液（单咖啡酰酒石酸浓度为 10 μg/mL）进行采集，其色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

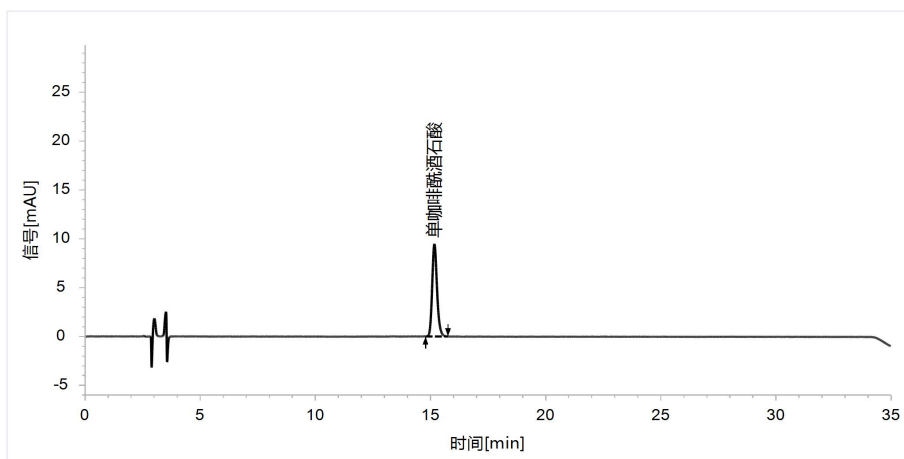


图 1 对照品溶液的色谱图

表 1 对照品溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU. s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	对称/拖尾 因子
单咖啡酰酒石酸	15.167	138.932	9.485	26213	1.21

由表 1 中数据可知，单咖啡酰酒石酸的理论塔板数为 26213，满足《中国药典（2025 年版）》中规定的单咖啡酰酒石酸峰理论塔板数应不低于 3000 的要求；拖尾因子为 1.21，具有良好的峰形。

将对照品溶液（单咖啡酰酒石酸浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ）连续进样 7 针，叠加的色谱图如图 2 所示，结果见表 2。

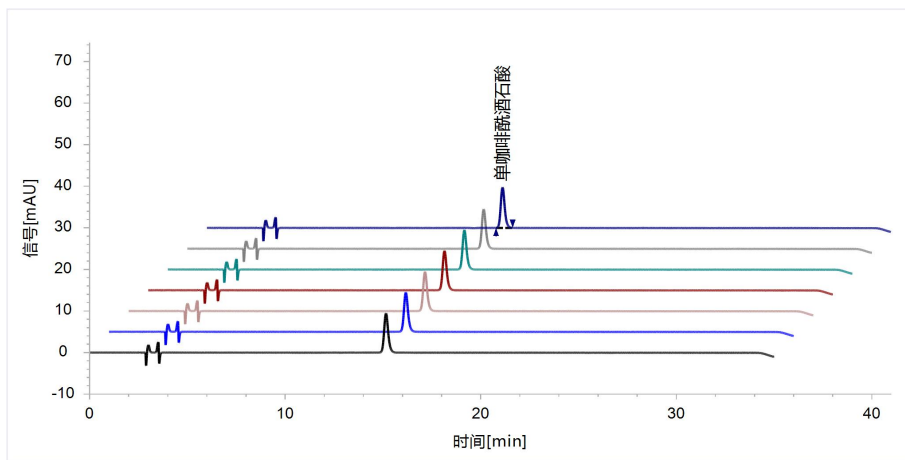


图 2 对照品溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

表 2 对照品溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	项目	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD%
单咖啡酰 酒石酸	保留时间 (min)	15.158	15.150	15.150	15.167	15.150	15.117	15.167	15.151	0.11
	峰面积 (mAU. s)	138.904	138.920	138.695	139.216	139.087	139.461	138.932	139.031	0.18

由表 2 中数据可知，将对照品溶液（单咖啡酰酒石酸浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ ）连续进样 7 针进行重复性测试，单咖啡酰酒石酸保留时间的 RSD 为 0.11 %，峰面积的 RSD 为 0.18 %，具有良好的定性定量重复性。

4.2 仪器灵敏度测试

按照色谱条件（3.6），将灵敏度溶液（3.3）进行测试，其色谱图如图 3 所示，计算结果见表 3。

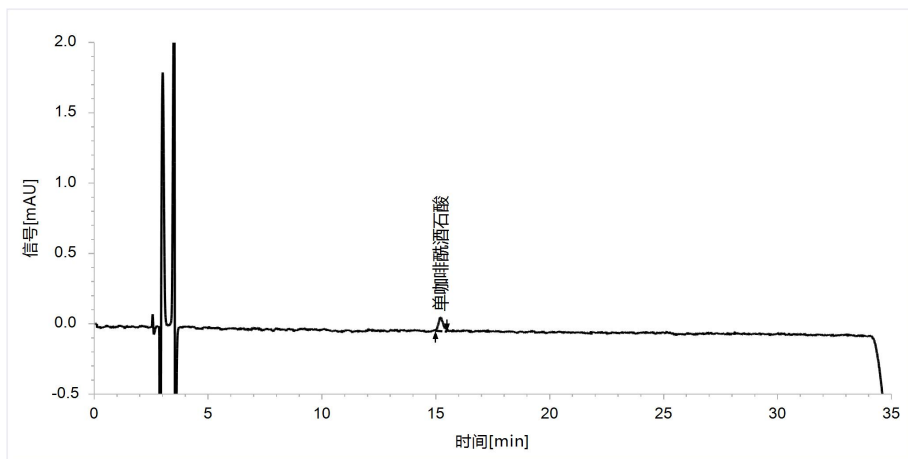


图 3 仪器灵敏度的色谱图

表 3 仪器灵敏度测试数据

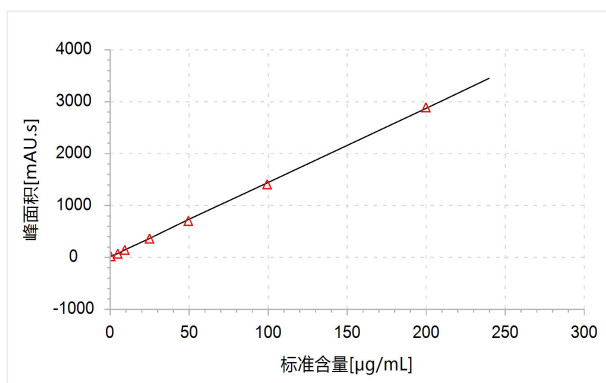
目标物	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
单咖啡酰酒石酸	0.1	0.099	0.021	4.7	0.07	0.22

由表 3 中数据可知，单咖啡酰酒石酸的仪器检出限为 $0.07 \mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 $0.22 \mu\text{g/mL}$ 。

4.3 含量测定

4.3.1 校准曲线绘制

按照色谱条件（3.6），将单咖啡酰酒石酸系列标准工作液（3.2）上机测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性方程和确定系数如图 4 所示，叠加色谱图见图 5。单咖啡酰酒石酸在 $1 \mu\text{g/mL} \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，曲线的确定系数 $R^2 \geq 0.999$ ，线性关系良好。



方程式	$y=14.36037*x-9.54707$
相关系数(R)	0.9999
确定系数(R ²)	0.9999

图 4 单咖啡酰酒石酸的校准曲线

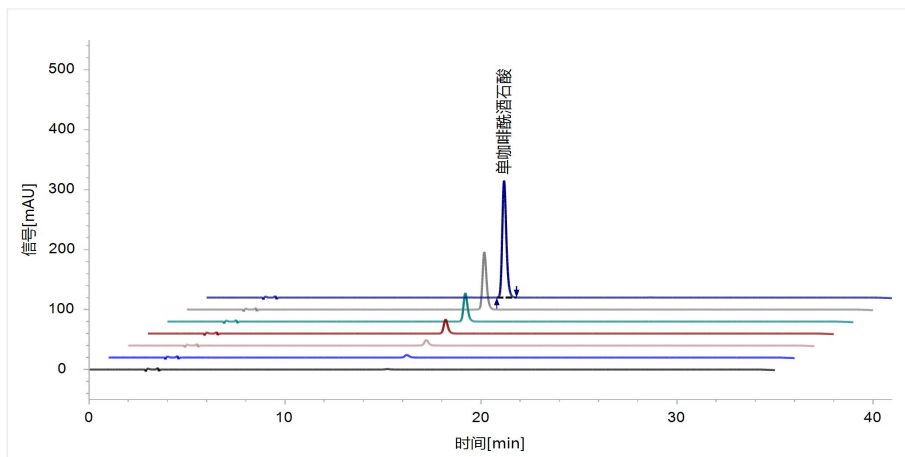


图 5 单咖啡酰酒石酸系列标准工作液叠加的色谱图

4.3.2 含量测定

以市售的热炎宁合剂（1.10）作为试样，按照 3.4 的流程对试样进行处理并进行加标回收实验。按照公式（1）计算试样中单咖啡酰酒石酸的含量。

$$\omega = \frac{\rho \times 100}{1000} \quad \text{----公式（1）}$$

式中： ω ----为试样中单咖啡酰酒石酸的含量，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

ρ ----为从校准曲线计算得到的供试品溶液中单咖啡酰酒石酸的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

100----为稀释倍数；

1000----为单位换算系数。

空白溶液、供试品溶液及供试品加标溶液的色谱图如图 6 ~图 8 所示。

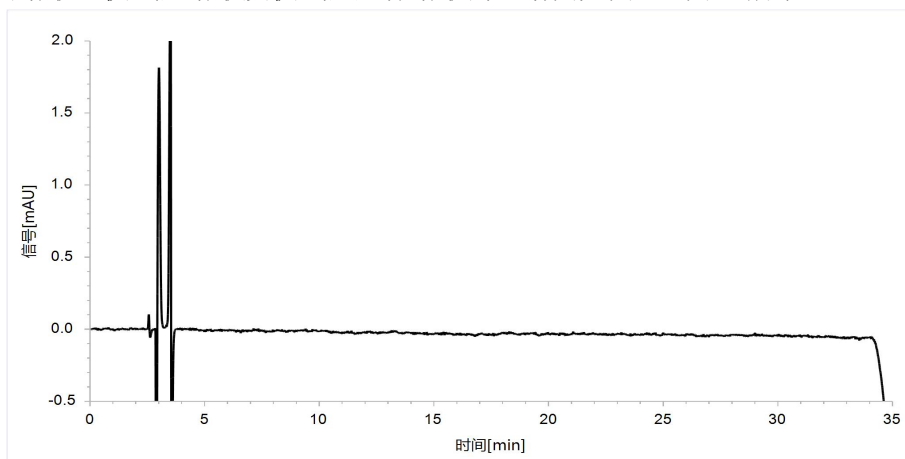


图 6 空白溶液的色谱图

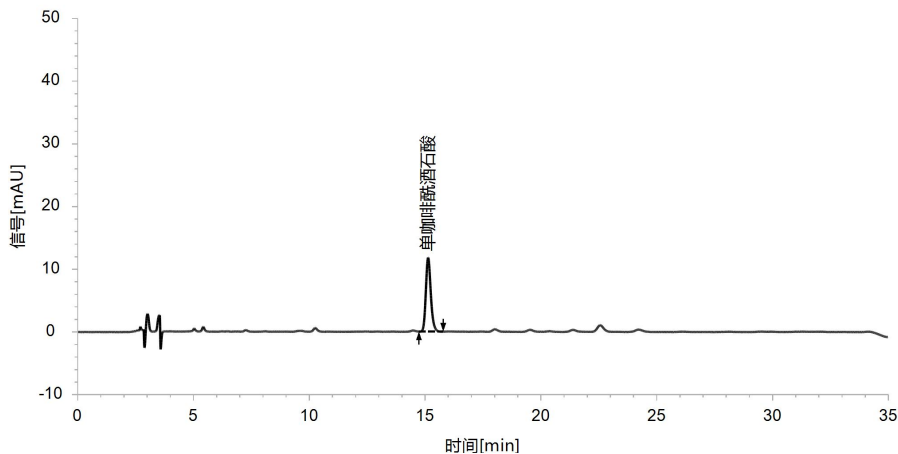


图 7 供试品溶液的色谱图

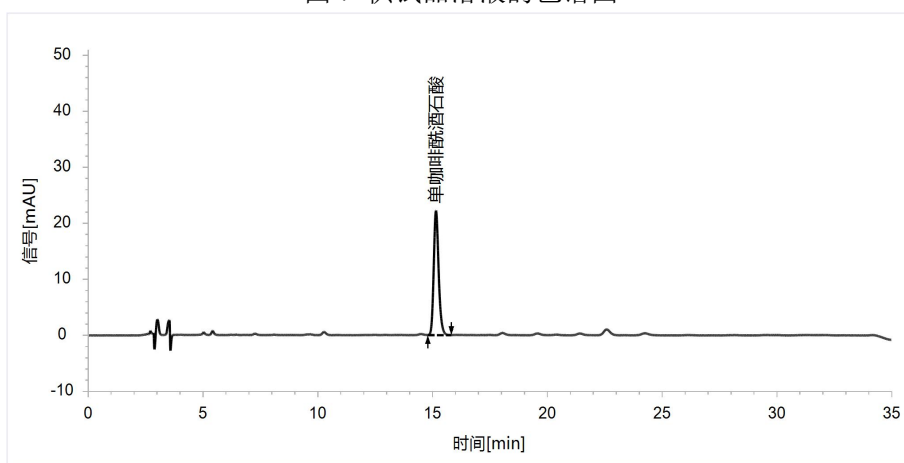


图 8 供试品加标溶液的色谱图

依据公式（1）进行计算，热炎宁合剂中单咖啡酰酒石酸的含量为 1.30 mg/mL，满足《中国药典（2025 年版）》中规定的含单咖啡酰酒石酸不得少于 0.40 mg/mL 的要求；加标回收实验中，单咖啡酰酒石酸的加标回收率为 106.7 %。

三、 结论

本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定市售热炎宁合剂中单咖啡酰酒石酸的含量。本实验以乙腈和 0.2 %磷酸水溶液为流动相，采用梯度洗脱条件，实验结果表明：单咖啡酰酒石酸的理论塔板数为 26213，满足《中国药典（2025 年版）》中规定的单咖啡酰酒石酸峰理论塔板数应不低于 3000 的要求；拖尾因子为 1.21，具有良好的峰形；重复性测试中，单咖啡酰酒石酸保留时间的 RSD 为 0.11 %，峰面积的 RSD 为 0.18 %，具有良好的定性定量重复性；灵敏度测试中，单咖啡酰酒石酸的仪器检出限为 0.07 μ g/mL，仪器定量限为 0.22 μ g/mL；单咖啡酰酒石酸在 1 μ g/mL~200 μ g/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系，确定系数 $R^2 \geq 0.999$ ；市售热炎宁合剂中单咖啡酰酒石酸的含量为 1.30 mg/mL，满足《中国药典（2025 年版）》中规

定的含单咖啡酰酒石酸不得少于 0.40 mg/mL 的要求；加标回收实验中，单咖啡酰酒石酸的加标回收率为 106.7 %。因此，悟空 K2025 高效液相色谱仪可以满足《中国药典（2025 年版）》中热炎宁合剂中单咖啡酰酒石酸含量测定的需求。

附 1: 仪器配置清单

序号	单元
K2025 二元高压梯度系统	
A)	<u>Pump Unit</u> 泵单元
1	62 Mpa 二元高压输液泵 (内置溶剂托盘)
2	流动相瓶 (肖特瓶, 1 L)
3	脱气机
4	四通道溶剂选择阀
5	自动在线清洗系统
B)	<u>Sample Injector</u> 进样器
1	自动进样器
2	样品瓶 (2 mL, 含瓶盖)
3	脱气组件
4	100 μ L 定量环
C)	<u>Column Oven</u> 柱温箱
1	色谱柱恒温箱 (室温以下 10 $^{\circ}$ C 至 85 $^{\circ}$ C)
2	色谱柱: JinGuBang C ₁₈ , 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m
D)	<u>Detector</u> 检测器
1	紫外-可见光检测器
E)	<u>Workstation</u> 工作站
1	Wookinglab 色谱工作站 (中文版) 00.03.58.05

附 2: 悟空 Wooking K2025 高效液相色谱仪 (可靠、精准、友好、合规)



报告人: 王文霞

联系方式: 15562662085