

菊苣复方指纹图谱的构建方法及其指纹图谱与应用

相关申请的交叉参考

本申请要求于 2023 年 08 月 11 日提交中国专利局、申请号为
5 202311014248.9、名称为“菊苣复方指纹图谱的构建方法及其指纹图谱与应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本公开中。

技术领域

本公开涉及中药检测技术领域，具体涉及一种菊苣复方指纹图谱的构建
10 方法及其指纹图谱与应用。

背景技术

菊苣复方是全国著名老中医张冰教授治疗痹证、急慢性痛风关节炎治验的高度凝练与总结，集中反映其整合论治代谢疾病的用药思路。张冰教授认为
15 痛风病发生的表象虽在关节，但其实质是以机体尿酸代谢紊乱为根本，加之外因而诱发的，故应治以健脾祛湿调整尿酸代谢，化浊除痹干预尿酸盐沉积。菊苣复方由菊苣、土茯苓、秦艽、茯苓、槐米组成，其中菊苣土茯苓健脾祛湿化浊、通利关节，调节尿酸代谢，共为君药；茯苓秦艽祛风湿除痹痛、
干预痛风性炎症肿痛，为臣药；槐米清热凉血、消炎止痛，为佐使药。全方
20 共奏健脾祛湿化浊、降酸消肿止痛之功。文献学及网络药理学研究表明，该方含多种可作用于尿酸生成、排泄及炎症途径的化学成分，具有多成分、多靶点、多功效的防治优势，是契合了痛风病现代病理认识的综合抗痛风病药物。

目前，对于菊苣复方的研究集中在临床应用及药理药效等方面，但缺乏
25 深入分析内在药效成分的差异对菊苣复方质量影响的有效方法。

中药指纹图谱是鉴别中药产品、评价其产品质量的一种有效手段。例如，“菊苣和毛菊苣的 HPLC 指纹图谱构建及模式识别研究”（《中国中药杂志》第 38 卷第 9 期，1401-1405 页）研究了菊苣和毛菊苣的 HPLC 指纹图谱的构建方法以及获得的 HPLC 指纹图谱的应用。但是，中药复方的成分复杂，该

文献中用于单味中药材的指纹图谱构建方法无法适用于中药复方。此外，该文献中采用有机溶剂甲醇超声提取菊苣和毛菊苣，与临床不符。

因此，建立菊苣复方的超高效液相色谱指纹特征图谱，并通过中药色谱特征图谱相似度评价系统对其进行分析，建立对照指纹图谱，为菊苣复方的

5

发明内容

本公开的发明目的是提供一种菊苣复方指纹图谱的构建方法及其指纹图谱与应用，以实现对菊苣复方品质的全面、客观、准确的评价。

10 本公开提供了一种菊苣复方指纹图谱的构建方法，包括如下步骤：

(1) 将菊苣复方制成供试品溶液；

(2) 采用从绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷构成的组中选

15

出的至少 2 种对照品制备混合对照品溶液；

(3) 分别将所述供试品溶液和所述混合对照品溶液注入高效液相色谱仪，对获得的色谱图进行相似度分析，得到所述菊苣复方指纹图谱。

可选地，在步骤 (1) 中，采用甲醇对所述菊苣复方的提取物粉末或浸膏粉进行提取，得到的上清液进行过滤得到滤液，作为所述供试品溶液；

20 优选地，在步骤 (1) 中，采用 70% 甲醇对所述菊苣复方的提取物粉末或浸膏粉进行提取，得到的上清液采用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤得到滤液，作为所述供试品溶液。

可选地，在步骤 (2) 中，采用绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷制备混合对照品溶液。

25

可选地，在步骤 (2) 中，将各对照品混合之后采用甲醇溶解，得到所述混合对照品溶液；或者，采用甲醇分别将各对照品配制成对照品溶液，然后

混合得到所述混合对照品溶液；

优选地，在步骤（2）中，将各对照品等比例混合之后采用 70% 甲醇溶解，得到每种对照品的含量是 1 $\mu\text{g/ml}$ 的所述混合对照品溶液；或者，采用 70% 甲醇分别将各对照品配制成 100 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液，然后混合得到每种
5 对照品的含量是 1 $\mu\text{g/ml}$ 的所述混合对照品溶液。

可选地，在步骤（3）中，所述高效液相色谱仪的色谱柱采用 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱，以甲醇为流动相 A，0.1% 甲酸水溶液为流动相 B，流速为 0.3 mL/min，柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量为 2 μL ，检测波长为 300 nm；

优选地，所述高效液相色谱仪的色谱柱采用规格是 2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μm 的 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱。
10

可选地，在步骤（3）中，所述高效液相色谱仪的洗脱条件是：

0~2 分钟，流动相 A 的体积分数由 5% 上升至 10%，流动相 B 的体积分数由 95% 下降至 90%；

2~16 分钟，流动相 A 的体积分数由 10% 上升至 40%，流动相 B 的体积
15 分数由 90% 下降至 60%；

16~26 分钟，流动相 A 的体积分数由 40% 上升至 54%，流动相 B 的体积分数由 60% 下降至 46%；

26~26.5 分钟，流动相 A 的体积分数由 54% 上升至 95%，流动相 B 的体积分数由 46% 下降至 5%；

20 26.5~27.5 分钟，流动相 A 的体积分数是 95%，流动相 B 的体积分数是 5%；

27.5~28 分钟，流动相 A 的体积分数由 95% 下降至 5%，流动相 B 的体积分数由 5% 上升至 95%。

本公开还提供了一种采用上述的构建方法得到的菊苣复方指纹图谱，所述菊苣复方指纹图谱包括 15 个指纹峰。其中，2 号峰的相对保留时间为 9.64 min，对应的化学物质为绿原酸；3 号峰的相对保留时间为 10.57 min，对应的化学物质为 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷；5 号峰的相对保留时间为 11.51 min，对应的化学物质为龙胆苦苷；8 号峰的相对保留时间为 16.73 min，对
25

应的化学物质为新落新妇苔；9号峰的相对保留时间为17.16 min，对应的化学物质为落新妇苔；10号峰的相对保留时间为18.50 min，对应的化学物质为芦丁；11号峰的相对保留时间为18.90 min，对应的化学物质为异落新妇苔。

- 5 本公开还提供了上述菊苣复方指纹图谱在鉴别和/或评价菊苣复方的质量中的应用。

本公开还提供了一种鉴别和/或评价菊苣复方的品质的方法，包括：将待测菊苣复方的高效液相色谱图与上述菊苣复方指纹图谱进行比较，将相似度大于0.9识别为合格。

- 10 由上述技术方案可知，本公开的菊苣复方指纹图谱的构建方法及其指纹图谱与应用，至少具有如下有益效果：

- 本公开根据菊苣复方中所含的活性成分，包括黄酮类、有机酸类、环烯醚萜苷类等的结构性质特点，通过实验确定了流动相组成、梯度洗脱程序、检测波长、色谱柱、柱温等色谱分析条件。经多次实验验证表明，采用本公
15 开的构建方法获得的菊苣复方指纹图谱可以全面、客观、准确的检测和评价菊苣复方的质量，为保证患者用药安全有效具有重要意义。

针对成分复杂的菊苣复方，本公开通过超高效液相色谱（UHPLC）更全面的揭示了其指纹图谱，是对单味药材菊苣和毛菊苣指纹图谱研究的更进一步补充。此外，本公开通过水煎煮的方法提取菊苣复方，更贴近临床用药。

20

附图概述

图1显示了本公开实施例1中10个批次的菊苣复方的共有指纹峰的保留时间。

- 25 图2显示了本公开实施例1中利用10个批次的菊苣复方获得的对照指纹图谱。

本公开的较佳实施方式

为了充分了解本公开的目的、特征及功效，通过下述具体实施方式，对本公开作详细说明。本公开的方法除下述内容外，其余均采用本领域的常规

方法或装置。除非另有说明，否则本公开中涉及的技术和科学术语均具有本领域技术人员通常理解的含义。

在本公开中，所谓“菊苣复方”是指以菊苣、茯苓、土茯苓、槐米和秦艽为原料药制成的中药组合物。优选的，该中药组合物由如下原料药制成：菊苣 6~18 重量份、茯苓 5~15 重量份、土茯苓 10~60 重量份、槐米 5~10 重量份和秦艽 3~10 重量份；进一步优选的，该中药组合物由如下原料药制成：菊苣 6~10 重量份、茯苓 10~15 重量份、土茯苓 20~40 重量份、槐米 5~10 重量份和秦艽 3~10 重量份；最优选的，该中药组合物由如下原料药制成：菊苣 9 重量份、茯苓 10 重量份、土茯苓 30 重量份、槐米 6 重量份和秦艽 9 重量份。具体地，可参考申请号是 202210821181.9 的中国发明专利申请中记载的中药组合物，该专利申请通过引用的方式整体并入本公开中。

菊苣复方含多种可作用于尿酸生成、排泄及炎症途径的化学成分，具有多成分、多靶点、多功效的防治优势。但是，目前中药复方制剂在含量控制上基本只有一个或两个指标性成分，质量控制单一、指标少，因此现有的评价方法难以全面反映药味多、多组分多靶标的菊苣复方组合物的质量状况。

针对这些问题，本公开的发明人将中药 HPLC 指纹图谱技术应用到菊苣复方的品质评价中，针对菊苣复方自身的活性成分与结构性质特点，对 HPLC 指纹图谱技术的流动相组成、梯度洗脱程序、检测波长、色谱柱、柱温等色谱分析条件进行优化与完善，并筛选相匹配的对照品，从而提出了一种菊苣复方指纹图谱的构建方法。

本研究采用超高效液相方法代替传统高效液相方法进行菊苣复方指纹图谱研究，能够使复方中的所有有效成分都很好的分离并同时检出、能够出峰较多、能够出峰稳定。

第一方面，本公开提供了一种菊苣复方指纹图谱的构建方法，包括：（1）将菊苣复方制成供试品溶液；（2）制备混合对照品溶液；（3）将供试品溶液和混合对照品溶液注入高效液相色谱仪，对获得的色谱图进行相似度分析，得到菊苣复方指纹图谱。下面结合一种具体实施方案，对本公开的菊苣复方指纹图谱的构建方法进行详细说明。

（1）将菊苣复方制成供试品溶液。

在本公开中,可以采用菊苣复方的提取物粉末或浸膏粉制备供试品溶液。

在一种优选的实施方案中,采用菊苣复方的提取物粉末制备供试品溶液。具体地,精密称定菊苣复方提取物粉末,置具塞锥形瓶中,加入 70% 甲醇提取,取提取液放冷至室温后再次称重,并用 70% 甲醇溶液补足缺失的重量,5 取上清液用滤膜过滤,取续滤液即得菊苣复方供试品溶液。其中,菊苣复方的提取物粉末的制备方法可以参考现有技术中的相关方案,本公开不作具体限定。

在另一种优选的实施方案中,采用菊苣复方的浸膏粉制备供试品溶液。具体地,精密称取浸膏粉,置具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇(v/v)定容至 10 mL,10 稀释至 6mg/mL,振摇,超声 30 min 滤过,取续滤液,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

其中,菊苣复方的浸膏粉的制备方法可以参考现有技术中的相关方案,仅作为一个示例,菊苣复方的浸膏粉可以采用如下方法制备:按照菊苣复方比例准确称取菊苣、秦艽、槐米、茯苓、土茯苓饮片,加 12 倍量水后浸泡15 30 min,进行加热煎煮。待沸腾后煎煮 1.5 h,过滤。重复提取 3 次,合并水煎液,于旋转蒸发仪减压浓缩至含生药量 1 g/mL,即得复方水煎浓缩液。将复方浓缩液置 80 °C 水浴锅蒸至无流动性后,放入真空干燥箱进行干燥,干燥温度保持 80 °C,持续干燥 7 天,取出,放至常温后粉碎,即得复方浸膏粉。

(2) 制备混合对照品溶液。

20 根据菊苣复方的活性成分特点,本公开选择从绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷构成的组中选出至少 2 种物质作为对照品,并且优选地,本公开采用绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、25 獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷作为对照品制备混合对照品溶液。

在本公开中,可以将各对照品混合之后采用甲醇溶解,得到混合对照品溶液;或者,也可以采用甲醇分别将各对照品配制成对照品溶液,然后混合

得到混合对照品溶液。

在一种优选的实施方案中，分别精密称取绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷对照品，置于容量瓶中，加 70% 甲醇溶解并定容摇匀，用微孔滤膜滤过，得混合对照品溶液。

在另一种优选的实施方案中，分别精密称定绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷对照品适量，加 70% 甲醇溶解分别制成每 1 ml 约含 100 μg 的溶液（即 100 μg/ml 的对照品溶液）。精密量取前述对照品溶液各 1 ml，置同一 100 ml 容量瓶中，加 70% 甲醇至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液，每 1 ml 混合对照品溶液含各对照品 1 μg，即在混合对照品溶液中，每种对照品的含量是 1 μg/ml。

（3）将供试品溶液和混合对照品溶液注入高效液相色谱仪，对获得的色谱图进行相似度分析，得到菊苣复方指纹图谱。

在本公开中，采用的色谱条件是：色谱柱采用 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱，其规格优选是内径 2.1mm、柱长 100 mm、粒径 1.8 μm，以甲醇为流动相 A，0.1% 甲酸水溶液为流动相 B，流速为 0.3 mL/min，柱温为 30 ℃，进样量为 2 μL，检测波长为 300nm。

在本公开中，按下表进行梯度洗脱：

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0-2	5→10	95→90
2-16	10→40	90→60
16-26	40→54	60→46
26-26.5	54→95	46→5
26.5-27.5	95	5
27.5-28	95→5	5→95

将通过高效液相色谱获得的色谱图导入中药色谱指纹图谱相似度评价系

统（2012.130723 版本），得到菊苣复方指纹图谱。

在此需要说明的是，本公开的构建方法中涉及的各种物质，例如中药材、对照品等，都可以通过市场购买获得。

第二方面，本公开提供了一种菊苣复方指纹图谱，包括 15 个指纹峰。

5 参考图 2 中的编号，本公开的菊苣复方指纹图谱的关键峰包括 2、3、5、8、9、10、11 号指纹峰等。其中，2 号峰的相对保留时间为 9.64 min，对应的化学物质为绿原酸；3 号峰的相对保留时间为 10.57 min，对应的化学物质为 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苣；5 号峰的相对保留时间为 11.51 min，对应的化学物质为龙胆苦苣；8 号峰的相对保留时间为 16.73 min，对应的化学物
10 质为新落新妇苣；9 号峰的相对保留时间为 17.16 min，对应的化学物质为落新妇苣；10 号峰的相对保留时间为 18.50 min，对应的化学物质为芦丁；11 号峰的相对保留时间为 18.90 min，对应的化学物质为异落新妇苣。

本公开的菊苣复方指纹图谱能够用于全面、客观、准确的检测和评价菊苣复方的质量，因此，在第三方面，本公开提供了一种鉴别和/或评价菊苣复方的品质的方法，包括：采用上述的色谱条件和梯度洗脱程序获得待测菊苣复方的高效液相色谱图，将该高效液相色谱图与本公开的菊苣复方指纹图谱进行比较，如果相似度大于 0.9，则认为待测菊苣复方为合格品。
15

实施例

20 下面通过实施例的方式进一步说明本公开，但并不因此将本公开限制在所述的实施例范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。

实施例 1：菊苣复方对照指纹图谱的建立及应用

25 1. 仪器与试剂、药材

Waters ACQUITY UPLC H-CLASS 超高效液相色谱仪，ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱；KQ-5200E 型超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司，功率 250 W，频率 40 kHz），MTW120 型电子天平（深圳美孚电子有限公

司)；粉碎机(小熊电器股份有限公司)。

甲醇、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司)；蒸馏水(香港屈臣氏实业有限公司)；纯水由实验室提供。

从全国各地收集菊苣复方中 5 味药材饮片,每味药材饮片 10 批,其产地
5 与批次见表 1 和表 2。

表 1

批次	编号	茯苓	批号	编号	土茯苓	批号	编号	槐米	批号
S1	F1	北京	H20502	T1	广东	180101	H1	河北	20191227
S2	F2	北京	221015003	T2	北京	220418001	H2	北京	190409004
S3	F3	安徽	20210324	T3	广东	01050901	H3	河北	20210513
S4	F4	安徽	H20901	T4	广东	20210401	H4	河北	93430801
S5	F5	安徽	220201	T5	广东	21112017	H5	河北	C23011202
S6	F6	安徽	22110201	T6	广东	22083102	H6	河北	C22080603
S7	F7	北京	22011901	T7	北京	20220813	H7	河北	539200601
S8	F8	湖南	194221001	T8	湖南	220602	H8	河北	C22081906
S9	F9	云南	221017002	T9	广东	1907096	H9	河北	2001049
S10	F10	云南	220417	T10	广东	20220813	H10	河北	C22092216

表 2

批次	编号	秦艽	批号	编号	菊苣	批号
S1	Q1	北京	180101	J1	新疆	181201
S2	Q2	北京	90850601	J2	新疆	20200326
S3	Q3	甘肃	00851201	J3	新疆	20201031
S4	Q4	甘肃	20210415	J4	新疆	20200329
S5	Q5	甘肃	200604004	J5	新疆	20210801
S6	Q6	内蒙	211206002	J6	新疆	20210807
S7	Q7	北京	20201004	J7	新疆	20210403
S8	Q8	甘肃	20112303	J8	新疆	20210813

S9	Q9	云南	220302	J9	辽宁	20200327
S10	Q10	甘肃	20220107	J10	安徽	20200328

2. 菊苣复方指纹图谱的构建

(1) 供试品溶液制备

按照菊苣 9 克、茯苓 10 克、土茯苓 30 克、槐米 6 克和秦艽 9 克，准确称取表 1 和表 2 中 S1 至 S10 批次的各饮片，获得 10 个批次的供试品。针对这 10 个批次的供试品，分别进行如下操作：

加 12 倍量水后浸泡 30 min，进行加热煎煮。待沸腾后煎煮 1.5 h，过滤。重复提取 3 次，合并水煎液，于旋转蒸发仪减压浓缩至含生药量 1 g/mL，即得复方水煎浓缩液。将复方浓缩液置 80 ℃ 水浴锅蒸至无流动性后，放入真空干燥箱进行干燥，干燥温度保持 80 ℃，持续干燥 7 天，取出，放至常温后粉碎，即得复方浸膏粉；

精密称取浸膏粉，置具塞锥形瓶中，加 70% 甲醇定容至 10 mL，稀释至 6 mg/mL，振摇，超声 30 min 滤过，取续滤液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

(2) 混合对照品溶液的制备

分别精密称定绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、水仙苷对照品适量，加 70% 甲醇溶解分别制成每 1 ml 约含 100 μg 的溶液。精密量取上述对照品溶液各 1 ml，置同一 100 ml 容量瓶中，加 70% 甲醇至刻度，摇匀，即得混合对照品溶液（每 1 ml 含各对照品 1 μg）；

(3) 超高效液相色谱法测定菊苣复方指纹图谱

将步骤（1）制备得到的 10 个批次的菊苣复方供试品溶液和步骤（2）制备得到的混合对照品溶液分别注入高效液相色谱仪。

色谱条件：色谱柱采用 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱（内径 2.1mm、柱长 100 mm、粒径 1.8 μm），以甲醇为流动相 A，0.1% 甲酸水溶液为流动相 B，流速为 0.3 mL/min，柱温为 30 ℃，进样量为 2 μL，检测波长为 300 nm，按下表进行梯度洗脱。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0-2	5→10	95→90
2-16	10→40	90→60
16-26	40→54	60→46
26-26.5	54→95	46→5
26.5-27.5	95	5
27.5-28	95→5	5→95

将获得的 10 个批次的菊苣复方供试品溶液的指纹图谱导出，并导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012.130723 版本）：选择 10 个批次菊苣复
方色谱图中均存在且含量较高的色谱峰作为共有峰；用中位数计算法生成菊
苣复方的对照指纹图谱，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积，对照
5 指纹图谱中有 15 个共有指纹峰，（10 批次供试品溶液的指纹图谱相识度均
大于 0.90）。

15 个共有指纹峰的保留时间如图 1 所示，本实施例获得的对照指纹图谱
如图 2 所示。

10 实施例 2：方法学考察

1. 精密度实验

精密吸取同一批次菊苣复方粉末，按上述实施例 1 的步骤(1)方法制备得
到供试品溶液，按上述实施例 1 步骤（3）色谱条件重复进样 6 次，计算共
有峰 1，2，3，5，6，7，8，10 的峰面积的 RSD 值均<4.0%，保留时间的
15 RSD 均<1.0%，证明仪器精密度良好。

2. 重复性试验

精密吸取同一批次菊苣复方粉末，按上述实施例 1 的步骤（1）方法平行
制备得到 6 份供试品溶液，按上述实施例 1 步骤（3）色谱条件进样 6 次，计
算共有峰 1，2，3，5，6，7，8，10 的峰面积的 RSD 值均<3.5%，保留时间
20 的 RSD 均<1.0%，证明该方法重复性良好。

3. 稳定性试验

精密吸取同一批次菊苣复方粉末，按上述实施例 1 的步骤（1）方法制备

得到供试品溶液，按上述实施例 1 步骤（3）色谱条件分别在制样后的 0 h、1 h、2 h、5 h、12 h 和 24 h 进样分析，计算共有峰 1，2，3，5，6，7，8，10 的峰面积的 RSD 值均<3.5%，保留时间的 RSD 均<1.0%，证明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

- 5 经过上述研究可以确定，本公开用指纹图谱技术建立了菊苣复方的 UHPLC 指纹图谱，可快速、直观地辨识复杂中药汤剂体系中的药效物质基础；同时结合灰色关联度分析和偏最小二乘法分析等化学识别模式，评价各批次样品之间的质量差异，为菊苣复方的关键质量属性研究提供参考，为后续相关制剂的制备工艺、质量控制以及产品安全性、稳定性的评价提供有益的参考。
- 10

最后，需要注意的是：以上列举的仅是本公开的具体实施例子，当然本领域的技术人员可以对本公开进行改动和变型，倘若这些修改和变型属于本公开权利要求及其等同技术的范围之内，均应认为是本公开的保护范围。

15

权 利 要 求 书

1. 一种菊苣复方指纹图谱的构建方法，其特征在于，包括如下步骤：

(1) 将菊苣复方制成供试品溶液；

5 (2) 采用从绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷构成的组中选出的至少 2 种对照品制备混合对照品溶液；

10 (3) 分别将所述供试品溶液和所述混合对照品溶液注入高效液相色谱仪，对获得的色谱图进行相似度分析，得到所述菊苣复方指纹图谱。

2. 根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，在步骤 (1) 中，采用甲醇对所述菊苣复方的提取物粉末或浸膏粉进行提取，得到的上清液进行过滤得到滤液，作为所述供试品溶液；

15 优选地，在步骤 (1) 中，采用 70% 甲醇对所述菊苣复方的提取物粉末或浸膏粉进行提取，得到的上清液采用 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤得到滤液，作为所述供试品溶液。

3. 根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，在步骤 (2) 中，采用绿原酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、3-O-咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、芦丁、异落新妇苷、异绿原酸
20 C、槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷制备混合对照品溶液。

4. 根据权利要求 3 所述的构建方法，其特征在于，在步骤 (2) 中，将各对照品混合之后采用甲醇溶解，得到所述混合对照品溶液；或者，采用甲醇分别将各对照品配制成对照品溶液，然后混合得到所述混合对照品溶液；

25 优选地，在步骤 (2) 中，将各对照品等比例混合之后采用 70% 甲醇溶解，得到每种对照品的含量是 1 μg/ml 的所述混合对照品溶液；或者，采用 70% 甲醇分别将各对照品配制成 100 μg/ml 的对照品溶液，然后混合得到每种对照品的含量是 1 μg/ml 的所述混合对照品溶液。

5. 根据权利要求 1 所述的构建方法，其特征在于，在步骤 (3) 中，所

述高效液相色谱仪的色谱柱采用 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱,以甲醇为流动相 A,0.1%甲酸水溶液为流动相 B,流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 °C,进样量为 2 μ L,检测波长为 300 nm;

5 优选地,所述高效液相色谱仪的色谱柱采用规格是 2.1 $\times$ 100 mm、1.8 μ m 的 ACCQUITY UPLC HSS T3 色谱柱。

6. 根据权利要求 5 所述的构建方法,其特征在于,在步骤(3)中,所述高效液相色谱仪的洗脱条件是:

0~2 分钟,流动相 A 的体积分数由 5%上升至 10%,流动相 B 的体积分数由 95%下降至 90%;

10 2~16 分钟,流动相 A 的体积分数由 10%上升至 40%,流动相 B 的体积分数由 90%下降至 60%;

16~26 分钟,流动相 A 的体积分数由 40%上升至 54%,流动相 B 的体积分数由 60%下降至 46%;

15 26~26.5 分钟,流动相 A 的体积分数由 54%上升至 95%,流动相 B 的体积分数由 46%下降至 5%;

26.5~27.5 分钟,流动相 A 的体积分数是 95%,流动相 B 的体积分数是 5%;

27.5~28 分钟,流动相 A 的体积分数由 95%下降至 5%,流动相 B 的体积分数由 5%上升至 95%。

20 7. 一种采用权利要求 1~6 任一项所述的构建方法得到的菊苣复方指纹图谱,其特征在于,所述菊苣复方指纹图谱包括 15 个指纹峰。

8. 根据权利要求 7 所述的菊苣复方指纹图谱,其特征在于,2 号峰的相对保留时间为 9.64 min,对应的化学物质为绿原酸;3 号峰的相对保留时间为 10.57 min,对应的化学物质为 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷;5 号峰的相对保留时间为 11.51 min,对应的化学物质为龙胆苦苷;8 号峰的相对保留时间为 16.73 min,对应的化学物质为新落新妇苷;9 号峰的相对保留时间为 17.16 min,对应的化学物质为落新妇苷;10 号峰的相对保留时间为 18.50 min,对应的化学物质为芦丁;11 号峰的相对保留时间为 18.90 min,对应的化学

25

物质为异落新妇苔。

9. 权利要求 7 或 8 所述的菊苣复方指纹图谱在鉴别和/或评价菊苣复方的质量中的应用。

10. 一种鉴别和/或评价菊苣复方的品质的方法，其特征在于，包括：将
5 待测菊苣复方的高效液相色谱图与权利要求 7 或 8 所述的菊苣复方指纹图谱进行比较，将相似度大于 0.9 识别为合格。