

败酱草及其混伪品的显微鉴别特征与 HPLC 指纹图谱研究

章 蕾, 黄子涵, 林紫怡, 钟晓明, 程汝滨, 黄 真*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: **目的** 对败酱草 *Herba Patriniae* 及其市场常见混伪品的显微鉴别特征和 HPLC 指纹图谱进行研究, 明确不同品种的败酱草及其混伪品间的差异, 为败酱草的准确鉴定提供技术保障。**方法** 收集败酱草正品药材黄花败酱和白花败酱, 市场常见败酱草混用品异叶败酱、蒜薹和苣荬菜, 采用显微鉴别方法对 5 种药材粉末的显微特征进行研究; 优化败酱草总皂苷的提取工艺, 比较不同品种的总皂苷含量; 建立败酱草及其混伪品的 HPLC 指纹图谱, 基于指纹图谱相似度评价、聚类分析和主成分分析, 对败酱草及其混伪品进行鉴别和药材质量的综合评价。**结果** 败酱草及其混伪品药材粉末的显微特征存在显著差异; 优化了败酱草总皂苷的提取工艺, 结果表明, 败酱草及其混伪品总皂苷含量存在差异; 建立了败酱草及其混伪品共 26 批的 HPLC 指纹图谱, 共标定了 11 个共有峰, 明确了败酱草及其混伪品指纹图谱的差异, 通过相似度分析、聚类分析和主成分分析, 可将败酱草及其混伪品进行准确区分; 综合评价分析结果表明, 败酱草及其混伪品的得分差异较大, 其中正品白花败酱和黄花败酱的得分最高。**结论** 获得了败酱草及其市场常见混伪品在粉末的显微特征和 HPLC 指纹图谱的差异, 为败酱草的准确鉴别和临床用药安全提供了技术支撑。

关键词: 败酱草; 混伪品鉴别; 指纹图谱; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)06-2066-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.028

Research of microscopic identification characteristics and HPLC fingerprints of *Herba Patriniae* and its adulterants

ZHANG Lei, HUANG Zirui, LIN Ziyi, ZHONG Xiaoming, CHENG Rubin, HUANG Zhen

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** To investigate the microscopic identification characteristics, HPLC fingerprints of Baijiangcao (*Herba Patriniae*) and its common adulterants in the market, determine the typical characters between different varieties of *Herba Patriniae* and its adulterants, and provide technical support for the accurate identification of *Herba Patriniae*. **Methods** The genuine medicinal materials of *Herba Patriniae*, *Patrinia scabiosaeifolia* and *P. villosa*, as well as its common adulterants of *Herba Patriniae*, including *Patrinia heterophylla*, *Thlaspi arvense* and *Sonchus arvensis* were collected from the herbal medicine market. The microscopic characteristics of five medicinal powders were identified and analyzed through typical microscopic identification method. The contents of total saponins from different varieties were determined with the optimized extraction approach of total saponins from *P. scabiosaeifolia*. The combined strategy based on HPLC fingerprints, similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis was performed to comprehensively evaluate and analyze the medicinal quality of *Herba Patriniae* and its adulterants. **Results** There was a significant difference between *Herba Patriniae* and its adulterants in the microscopic characteristic. The optimized extraction approach of total saponins from *P. scabiosaeifolia* was determined. The total saponins contents from *Herba Patriniae* and its adulterants were different. The fingerprints of *Herba Patriniae* and its adulterants were established, and 11 common peaks were identified. There were significant differences in fingerprints of different varieties. Based on similarity analysis, cluster analysis and principal component analysis, *Herba Patriniae* and its adulterants can be distinguished. The results of comprehensive evaluation and analysis showed that the scores of *Herba Patriniae* and its adulterants are quite different, among which genuine *Patrinia villosa* and *P.*

收稿日期: 2023-09-09

基金项目: 国家大学生创新创业训练项目 (202110344001X)

作者简介: 章 蕾 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源品质评价及开发利用。

Tel: 17742020516 E-mail: zhanglei10804@163.com

*通信作者: 黄 真 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源品质评价及开发利用。

Tel: (0571)61768168 E-mail: huangzhen@zcmu.edu.cn

scabiosaefolia had the highest scores. **Conclusion** In this study, the differences of powder microscopic characteristics and HPLC fingerprints among *Herba Patriniae* and its adulterants was obtained, which provided technical support for accurate identification of *Herba Patriniae* and further clinical medication safety. These results would also contribute to the resource utilization and development of potential medicinal value of the market adulterants of *Herba Patriniae*.

Key words: *Herba Patriniae*; authentic identification; HPLC fingerprints; cluster analysis; principal component analysis

败酱草为败酱科多年生草本植物黄花败酱 *Patrinia scabiosaefolia* Fisch. ex Trev 和白花败酱 *P. villosa* Juss 的带根全草^[1], 全国大部分地区均有分布。败酱草首载于《神农本草经》, 被列为中品, 其味辛、苦, 性微寒, 具有清热解毒、消痈排脓、祛瘀止痛之功效^[1]。败酱草在我国古代本草中最早记载为黄花败酱, 直到明代李时珍才首次记载收录白花败酱(攀倒甑)^[2]。现代研究表明, 败酱草的有效成分主要为黄酮类、三萜皂苷类、苯丙素类、萜烯类和挥发油类等^[3], 其中黄花败酱富含三萜皂苷和挥发油, 而白花败酱含有更多的黄酮类化合物^[4]。败酱草在抗炎、抗肿瘤、抗氧化等方面均显示良好的药理活性^[4-5]。针对皂苷类成分, 已有研究表明其具有较好的抗炎、抗肿瘤^[1]等作用。目前败酱草的临床应用广泛, 在消化科、皮肤科、呼吸内科、泌尿科以及妇科等多方面疾病均有重要的应用价值, 具有很好的药用价值和开发前景^[6]。但目前败酱草皂苷类成分的提取工艺研究相对较少, 其提取工艺的不成熟一定程度上限制了后续药理活性的评价和应用开发。

菝葜菜、蔊菜及异叶败酱作为败酱草的常见市场混伪品, 其功能主治、化学成分、药理作用与败酱草均有显著差异, 混用易导致临床的安全隐患。导致败酱草及其混伪品混用的原因复杂, 一方面药材的名称和性状近似, 不易区分, 另一方面, 区域性用药习惯差异以及本草传承中品种误用等因素加剧了市场上败酱草混伪品流通问题。《本草纲目》中首次在败酱草品种项下添加“苦菜”这一别称^[7], 此后的本草书中多在败酱草项下使用“苦菜”一名。市场上常见混用品菝葜菜 *Sonchus arvensis* L. 为菊科植物菝葜菜的带根全草, 北方民间称其为“苦菜”, 并将其作为蔬菜食用。败酱草与菝葜菜相同的“苦菜”别称是引起二者混用的主要原因。蔊菜 *Thlaspi arvense* L. 为十字花科植物蔊菜的地上部分, 别名为苏败酱^[8]。此外, 蔊菜为带果全草, 其叶往往脱落, 与白花败酱的无叶果枝性状相似^[9], 其卵圆形扁平果实与白花败酱

团扇状苞片相似, 名称与性状的相似更易引起二者混用。败酱属常用药用植物异叶败酱 *P. heterophylla* Bunge, 其根入药, 名为墓头回, 异叶败酱地上部分与败酱草性状相似, 易混作败酱草用。败酱草及其混伪品虽均有清热解毒的功效, 但菝葜菜、蔊菜不具有排脓祛瘀的功效, 用于妇科疾病效果欠佳, 混用会影响临床疗效, 甚至导致病情加剧及产生过敏反应等不良反应^[10-11]。由此可见, 败酱草混伪品的使用会给临床安全合理用药带来严重隐患, 也不利于败酱草规范使用标准的制定。

HPLC 色谱具有分离效能高、分析速度快及仪器自动化等优点, 与多种指纹图谱数据评价方法相结合, 广泛应用于中药药材物种鉴别^[12]、药材质量评价^[13]、化学成分分析^[14]以及谱效关系研究^[15]等多个方面, 本研究采用生药学鉴定、Box-Behnken 法优化败酱草中总皂苷的提取工艺, 测定败酱草及其混伪品的总皂苷得率, 并建立败酱草及其混伪品 HPLC 指纹图谱, 结合相似度分析、聚类分析和主成分分析对其进行鉴别, 使用传统鉴别方法结合现代鉴别手段对败酱草及其市场上常见混伪品进行区分鉴别, 以期对败酱草的准确鉴别和临床用药安全提供一定技术支撑与保障, 同时为败酱草及其市场伪品的资源利用和潜在药用价值的开发提供一定参考。

1 材料

试验用败酱草及其混伪品共 5 种药材, 根据产地或批次不同分为 26 批, 编号为 S1~S26, 来源信息见表 1, 药材均购自中药材市场, 经浙江中医药大学药学院黄真教授鉴定为败酱科黄花败酱 *P. scabiosaefolia* Fisch. ex Trev、白花败酱 *P. villosa* Juss、异叶败酱 *P. heterophylla* Bunge, 十字花科蔊菜 *Thlaspi arvense* L.、菊科菝葜菜 *S. arvensis* L.。

熊果苷(批号 T17S681, 上海源叶生物科技有限公司); 齐墩果酸(批号 YN1101SA14, 上海源叶生物科技有限公司); 常春藤皂苷元(批号 DSTDC006601, 成都乐美天医药/德思特生物, 以上

表 1 样品来源

Table 1 The sample source

样品	品种	来源地	样品	品种	来源地
S1	白花败酱	浙江杭州	S14	黄花败酱	浙江杭州
S2	白花败酱	浙江衢州	S15	黄花败酱	浙江杭州
S3	白花败酱	浙江衢州	S16	黄花败酱	安徽亳州
S4	白花败酱	浙江衢州	S17	黄花败酱	安徽亳州
S5	白花败酱	浙江衢州	S18	黄花败酱	安徽亳州
S6	白花败酱	浙江衢州	S19	异叶败酱	浙江杭州
S7	苣荬菜	安徽亳州	S20	异叶败酱	陕西西安
S8	苣荬菜	安徽亳州	S21	异叶败酱	浙江杭州
S9	苣荬菜	安徽亳州	S22	异叶败酱	浙江杭州
S10	苣荬菜	安徽亳州	S23	荬蓂	河北保定
S11	苣荬菜	安徽亳州	S24	荬蓂	河北保定
S12	苣荬菜	安徽亳州	S25	荬蓂	河北保定
S13	黄花败酱	浙江杭州	S26	荬蓂	河北保定

对照品质量分数均>98%；甲醇、乙腈（色谱纯，美国 Tedia 公司）；稀甘油、水合氯醛、乙醇、磷酸、冰醋酸、高氯酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；香草醛（分析纯，上海麦克林生化科技有限公司）；超纯水（Milli-Q 超纯水系统制备）。

SCLIPSE Ci-L 型生物显微镜（日本 Nikon 公司）；UV-1800 紫外分光光度计（日本岛津公司）；DZF 数显鼓风干燥箱（上海博讯实业有限公司）；AL104 电子天平（上海梅特勒-托利多仪器有限公司）；RE-52AA 旋转蒸发仪（上海荣亚生化仪器厂）；恒温水浴锅（上海宜昌仪器厂）；Waters 高效液相色谱仪（美国 Waters 公司）。

2 方法

2.1 显微鉴定

采用显微鉴别方法对黄花败酱、白花败酱、异叶败酱、苣荬菜、荬蓂进行生药学鉴定。

2.2 黄花败酱总皂苷的提取工艺优化

2.2.1 黄花败酱总皂苷的提取 将 5 种药材样品烘干至恒定质量，研磨至粉碎后得到样品粉末（过 5 目筛）。精密称取粉末 1.0 g，在一定提取温度、液料比、提取时间、乙醇体积分数下于恒温水浴锅中进行冷凝回流提取，将得到的提取液抽滤，残渣加水 10 mL 溶解，用水饱和的正丁醇溶液萃取 2 次，每次 25 mL，合并正丁醇液，回收正丁醇至干，残渣加甲醇溶液溶解并定容至 50 mL，作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液配制 精密称取齐墩果酸对照品 10.10 mg，置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 0.202 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 检测波长的选择 取对照品溶液 1 mL，置具塞试管中，水浴挥干，冷却，采用香草醛-冰醋酸-高氯酸比色法，在 200~800 nm 进行全波长扫描，反应液在 545 nm 处有明显特征峰。选取可见区域 545 nm 的特征吸收峰位作为检测波长。

2.2.4 齐墩果酸标准曲线的绘制 参考文献的方法^[16]并加以修改，以齐墩果酸浓度为横坐标（X），吸光度为纵坐标（Y），绘制标准曲线，计算回归方程，结果表明齐墩果酸在 16.833 3~33.666 7 μg/mL，呈良好的线性关系。回归方程为 $Y=0.048\ 2\ X-0.122\ 4$ ， $R^2=0.999\ 1$ 。

2.2.5 黄花败酱总皂苷的测定 准确吸取供试品溶液 0.4 mL 于 10 mL 试管中，加甲醇溶液溶解并稀释至刻度，取待测溶液 1 mL 于具塞试管中，水浴挥干，冷却，加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL，摇匀，60 ℃水浴保温 15 min，取出，冰水浴中立即冷却，加入冰醋酸 5 mL，摇匀，随性试剂作空白，按照分光光度法，在 545 nm 波长处测定吸收度，测定总皂苷时以齐墩果酸为对照品制作标准曲线，按公式计算黄花败酱总皂苷得率（Y）。

$$Y=C\times V\times N/M$$

Y 为黄花败酱总皂苷得率，C 为总皂苷的质量浓度，V 为测量总皂苷提取液体积，N 为稀释倍数，M 为称量的黄花败酱质量

2.2.6 单因素实验 按照设定条件进行工艺提取，每组试验设定提取温度（50、60、70、80、90 ℃）、液料比（15：1、20：1、25：1、30：1、35：1、40：1）、提取时间（30、60、90、120、150 min）、乙

醇体积分数(50%、60%、70%、80%、90%、100%)中的一项因素为变量,控制其他3项因素为定量,以黄花败酱总皂苷得率为评价指标,每组试验平行重复3次。

2.2.7 Box-Behnken 响应面法优化提取工艺 根据单因素试验结果,以提取温度(A)、液料比(B)、提取时间(C)、乙醇体积分数(D)作为影响因素,总皂苷得率为评价指标(Y),应用 Box-Behnken 中心组合进行4因素3水平的试验设计。将因素水平(-1、0、1)设定为提取温度70、80、90℃,液料比25:1、30:1、35:1,提取时间90、120、150 min,乙醇体积分数为80%、90%、100%。

2.3 指纹图谱的建立

2.3.1 混合对照品溶液的制备 取熊果苷、齐墩果酸、常春藤皂苷元对照品,加甲醇制成含熊果苷0.376 mg/mL、齐墩果酸0.416 mg/mL、常春藤皂苷元0.392 mg/mL的混合对照品溶液,备用。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取各药材粉末1.0 g,以最佳提取工艺进行提取,抽滤,滤液转移至50 mL量瓶中,定容至刻度。后置于蒸发皿中,蒸干,残渣加甲醇超声溶解,转移至5 mL量瓶中,定容至刻度,用0.22 μm微孔滤膜滤过,得到供试品溶液,备用。

2.3.3 色谱条件 色谱柱为 Waters Sunfire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%磷酸水-乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 10%乙腈;5~8 min, 10%~13%乙腈;8~32 min, 13%~16%乙腈;32~37 min, 16%~20%乙腈;37~40 min, 20%~22%乙腈;40~52 min, 22%~24%乙腈;52~55 min, 24%~34%乙腈;55~60 min, 34%~40%乙腈;60~63 min, 40%~50%乙腈;63~90 min, 50%~100%乙腈);体积流量1.0 mL/min;检测波长为230 nm;柱温为40℃;进样量为10 μL。

2.3.4 精密度试验 取样品(S1),按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.3”项条件下连续进样6次^[17],以熊果苷峰为参考峰,计算得出各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD值分别小于0.35%、1.22%,表明该仪器的精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取样品(S1),按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.3.3”项条件下,分别在0、2、4、8、12、24 h进样测定^[17],计算得出各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD值分别小于1.76%、1.8%,表明供试品在24 h内稳定性

良好。

2.3.6 重复性试验 取6份样品(S1),按“2.3.2”项下方法分别制备供试品溶液,在“2.3.3”项条件下进样测定^[17],计算得出各共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD值分别小于1.05%、2.06%,表明该方法的重复性良好。

2.4 指纹图谱分析

2.4.1 相似度评价 将26批样品液相色谱图数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)进行分析,以S1样品色谱图为参照图谱,采用中位数法生成对照图谱,时间窗宽度设置为0.1 min,进行多点校正和自动峰匹配,生成指纹叠加图谱,确定共有峰,进行相似度评价。

2.4.2 聚类分析 采用 SPSS 25.0 软件以26批样品的共有峰峰面积为变量,采用组间连接聚类方法,以平方欧式距离为度量标准进行系统聚类分析。

2.4.3 主成分分析 采用 SPSS 25.0 软件对26批样品的指纹图谱数据进行主成分分析,采用降维、因子分析,计算相关系数矩阵,主成分特征值、累积贡献率及主成分综合得分等。

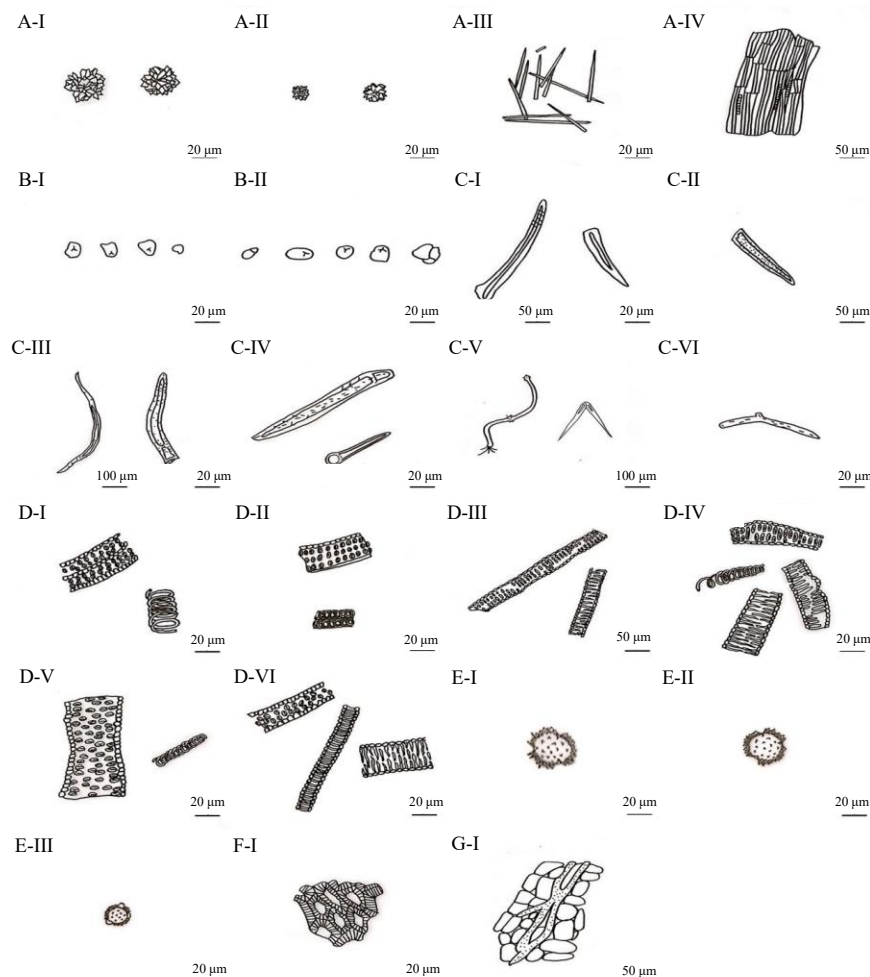
3 结果与分析

3.1 败酱草及其混伪品粉末的显微鉴别研究

5种药材在显微特征方面均存在一定差异,败酱草中草酸钙结晶类型主要为草酸钙簇晶,类圆形,棱角钝,白花败酱中较多,直径15~35 μm,黄花败酱中较少,直径10~17 μm;淀粉粒较多,且多为类圆形单粒,黄花败酱中直径6.5~12 μm,脐点点状或人字状,白花败酱中直径5~32 μm,脐点短缝状、人字状或三叉状;非腺毛有一种,壁较厚,表面具疣状突起;导管类型主要为螺纹导管和具缘纹孔导管,直径3.5~35 μm;花粉粒淡黄色,呈类球形,具3萌发沟,直径33~40 μm。混伪品中草酸钙结晶类型为草酸钙方晶且数量较少,直径约5 μm;淀粉粒少见;异叶败酱中非腺毛有2种,均为单细胞,分别为厚壁与薄壁非腺毛,具壁疣,萼片中非腺毛有3种,分别为平直厚壁多细胞非腺毛、薄壁多细胞长非腺毛、薄壁单细胞角锥形非腺毛,苣荬菜中非腺毛类型为丁字形多列式;异叶败酱中导管类型主要为网纹、孔纹、梯纹导管,萼片和苣荬菜中的导管类型主要为螺纹导管,直径5~33 μm,其他类型导管少见;苣荬菜中花粉粒黄色,类圆形,有3萌发孔,直径22~30 μm。

花粉粒的形状、大小、表面纹理、外壁萌发孔和雕纹的形态等常因植物品种不同而异，对鉴定中药有重要意义，是中药显微鉴别的标志性特征之一。在败酱草正品白花败酱和黄花败酱中均观察到类球形、具 3 萌发沟、外壁有断刺的花粉粒，可作为败酱草的特征鉴别依据。混伪品药材中仅在苣荬菜中观察到花粉粒，其萌发孔与败酱草可明显区分。此外，混伪品药材粉末中的部

分特殊结构也可将正品与混伪品进行区分，如针晶仅在异叶败酱中观察到，可作为异叶败酱的特征鉴别依据；橙色种皮表皮石细胞仅在苣荬菜中观察到，可作为苣荬菜的特征鉴别依据；苣荬菜为菊科植物，存在褐色乳汁碎片及内有黄棕色颗粒状分泌物的乳汁管，可作为苣荬菜特征鉴别依据。因此，显微鉴别可以简单鉴别败酱草及其混伪品。具体显微特征见图 1。



A-I-黄花败酱草酸钙簇晶, A-II-白花败酱草酸钙簇晶, A-III-异叶败酱草酸钙针晶, A-IV-苣荬草酸钙方晶, B-I-黄花败酱淀粉粒, B-II-白花败酱淀粉粒, C-I-黄花败酱非腺毛, C-II-白花败酱非腺毛, C-III-异叶败酱非腺毛, C-IV、C-V-苣荬非腺毛, C-VI-苣荬菜非腺毛, D-I-黄花败酱导管, D-II、D-III-白花败酱导管, D-IV-异叶败酱导管, D-V-苣荬导管, D-VI-苣荬菜导管, E-I-黄花败酱花粉粒, E-II-白花败酱花粉粒, E-III-苣荬菜花粉粒, F-I-苣荬种皮表皮石细胞, G-I-苣荬菜乳汁管。

A-I-calcium oxalate cluster crystal of *P. scabiosaefolia*, A-II-calcium oxalate cluster crystal of *P. villosa*, A-III-calcium oxalate needle crystal of *P. heterophylla*, A-IV-calcium oxalate cristobalite of *Thlaspi arvense*, B-I-starch granule of *P. scabiosaefolia*, B-II-starch granule of *P. villosa*, C-I-non glandular hair of *P. scabiosaefolia*, C-II-non glandular hair of *P. villosa*, C-III-non glandular hair of *P. heterophylla*, C-IV、C-V-non glandular hair of *T. arvense*, C-VI-non glandular hair of *S. arvensis*, D-I-conduit of *P. scabiosaefolia*, D-II、D-III-conduit of *P. villosa*, D-IV-conduit of *P. heterophylla*, D-V-conduit of *T. arvense*, D-VI-conduit of *S. arvensis*, E-I-microspore of *P. scabiosaefolia*, E-II-microspore of *P. villosa*, E-III-microspore of *S. arvensis*, F-I-epidermal stone cell of *T. arvense*, G-I-latex tube of *S. arvensis*.

图 1 败酱草及其混伪品粉末的显微特征

Fig. 1 Microscopic characteristics of powder of *Herba Patriniae* and its adulterants

3.2 败酱草总皂苷的提取工艺优化研究

以黄花败酱为研究对象，在单因素实验的基础上，采用 Box-Behnken 响应面法优化败酱草总皂苷的提取工艺，为败酱草及其混伪品的总皂苷提取奠定基础。

提取温度、液料比、提取时间和乙醇体积分数对黄花败酱总皂苷得率影响的结果如图 2 所示。总皂苷得率随着温度的升高先升高后下降，并在提取温度 80 ℃ 时达到最大值，故确定 80 ℃ 为最佳提取温度；总皂苷得率随着液料比的增大先升高后略有

下降，并在液料比 30 : 1 时达到最大值，故确定 30 : 1 为最佳提取液料比；总皂苷得率随着时间的增加先升高后下降，并在提取时间 120 min 时达到最大值，故确定 120 min 为最佳提取时间。总皂苷得率随着乙醇体积分数增加先升高后下降，在 90% 时达到最大值，故确定 90% 为最佳乙醇体积分数。

综合上述因素，确定响应面分析的各因素考察水平分别为提取温度 70、80、90 ℃，液料比 25 : 1、30 : 1、35 : 1，提取时间 90、120、150 min，乙醇体积分数 80%、90%、100%。

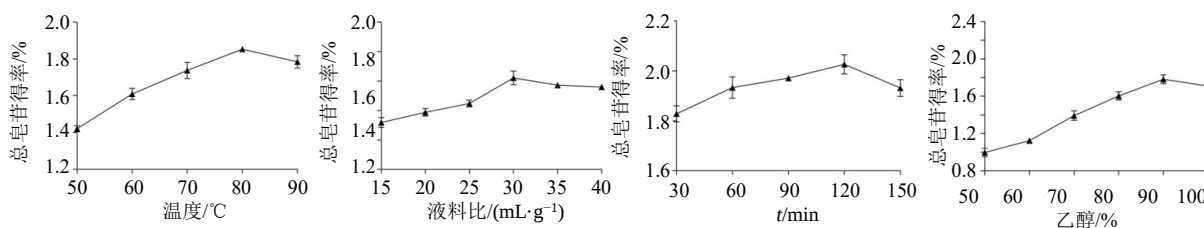


图 2 单因素实验结果

Fig. 2 Single factor test results

在黄花败酱总皂苷提取的单因素试验基础上，以提取温度 (A)、液料比 (B)、提取时间 (C) 和乙醇体积分数 (D) 为自变量，以总皂苷得率 (Y) 为响应值，采用 Design-Expert 8.0.6 软件设计 4 因素 3 水平共 29 个试验点，结果见表 2，得到总皂苷得率关于提取温度 (A)、液料比 (B)、提取时间 (C) 和乙醇体积分数 (D) 的二阶多项式方程：

$$Y = 2.53 + 0.013 A - 0.043 B + 0.007 5 C + 0.062 D - 0.015 AB + 0.080 AC - 0.060 AD - 0.032 BC - 0.035 BD + 0.065 CD - 0.19 A^2 - 0.075 B^2 - 0.11 C^2 - 0.094 D^2$$

由表 3 可知，试验所选模型的决定系数 $R^2 = 0.959 5$ ，修正相关系数 $R^2_{adj} = 0.919 0$ ，模型 $F = 23.690$ ， $P < 0.000 1$ ，表明该模型具有极显著性意义；失拟项 $P > 0.05$ ，无显著性差异，表明该模型与试验数据拟合程度良好。B、D、AC、AD、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 的 P 值均小于 0.05，表明其对总皂苷得率具有显著性影响。各因素的影响程度通过 F 值反映， F 值越大代表该因素的影响程度越大，故各因素对总皂苷得率的影响次序乙醇体积分数 (D) > 液料比 (B) > 提取温度 (A) > 提取时间 (C)。

通过软件 Design-Expert 10.0 软件分析可知，黄花败酱总皂苷的最优提取条件为提取温度

80.30 ℃，液料比 27.69 mL/g，提取时间 128.03 min，乙醇为 95%，预测总皂苷得率为 2.55%。考虑到实际操作，最终将其确定为提取温度 80 ℃，液料比 28 mL/g，提取时间 128 min，乙醇体积分数 95%。此条件下对建立的数学模型进行验证，获得的黄花败酱总皂苷实际测得值为 $(2.57 \pm 0.05) \%$ ，与预测值相差小，说明该模型符合黄花败酱总皂苷提取工艺研究及后续数据利用。

3.3 败酱草及其混伪品总皂苷得率的比较分析

以最佳提取工艺对败酱草及其混伪品样品进行总皂苷提取，平行 3 次，测得各样品总皂苷得率，如图 3 所示。其中黄花败酱、白花败酱、异叶败酱的总皂苷得率较高，分别为 2.57%、3.48% 和 2.72%；菥蓂、苣荬菜的总皂苷得率较低，白花败酱总皂苷含量显著高于其市场伪品总皂苷含量，黄花败酱总皂苷含量显著高于菥蓂、苣荬菜总皂苷含量，不进行准确区分鉴定将影响其临床疗效，并带来一定的安全隐患。

3.4 败酱草及其混伪品 HPLC 指纹图谱研究

将 26 批样品液相色谱图数据导入一中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版) 进行分析，分别生成 5 个物种的对照图谱，如图 4-B~F 所示，26 批样品叠加图谱中标定 11 个共有峰分别为 1~4、9、

表 2 响应面试验设计及结果
Table 2 Design and results of response surface tests

试验号	A/℃	B/(mL·g ⁻¹)	C/min	D/%	E/%
1	70	35	120	90	2.22
2	80	30	150	80	2.20
3	90	30	90	90	2.10
4	90	30	150	90	2.32
5	80	30	120	90	2.55
6	90	35	120	90	2.27
7	80	35	120	80	2.30
8	80	30	90	80	2.35
9	70	30	120	80	2.08
10	80	25	120	100	2.49
11	70	30	90	90	2.30
12	70	30	120	100	2.36
13	80	30	120	90	2.51
14	80	30	120	90	2.51
15	80	30	120	90	2.54
16	90	30	120	100	2.28
17	80	35	90	90	2.31
18	80	35	150	90	2.25
19	80	25	120	80	2.32
20	80	25	150	90	2.44
21	90	30	120	80	2.24
22	80	25	90	90	2.37
23	70	25	120	90	2.23
24	70	30	150	90	2.20
25	80	30	90	100	2.33
26	80	30	120	90	2.53
27	80	35	120	100	2.33
28	80	30	150	100	2.44
29	90	25	120	90	2.34

表 3 方差分析
Table 3 Analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.430 0	14	0.030 0	23.690	<0.000 1
A	0.002 1	1	0.002 1	1.660	0.218 2
B	0.022 0	1	0.022 0	16.880	0.001 1
C	0.000 7	1	0.000 7	0.530	0.480 3
D	0.046 0	1	0.046 0	35.550	<0.000 1
AB	0.000 9	1	0.000 9	0.700	0.416 5
AC	0.026 0	1	0.026 0	19.940	0.000 5
AD	0.014 0	1	0.014 0	11.220	0.004 8
BC	0.004 2	1	0.004 2	3.290	0.091 1
BD	0.004 9	1	0.004 9	3.820	0.071 0
CD	0.017 0	1	0.017 0	13.170	0.002 7
A ²	0.240 0	1	0.240 0	184.500	<0.000 1
B ²	0.036 0	1	0.036 0	28.300	0.000 1
C ²	0.075 0	1	0.075 0	58.210	<0.000 1
D ²	0.057 0	1	0.057 0	44.250	<0.000 1
残差	0.018 0	14	0.001 3		
失拟项	0.017 0	10	0.017 0	5.220	0.062 8
误差项	0.001 3	4	0.001 3		
总和	0.440 0	28			

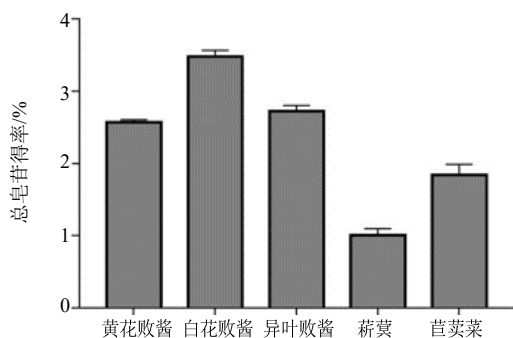
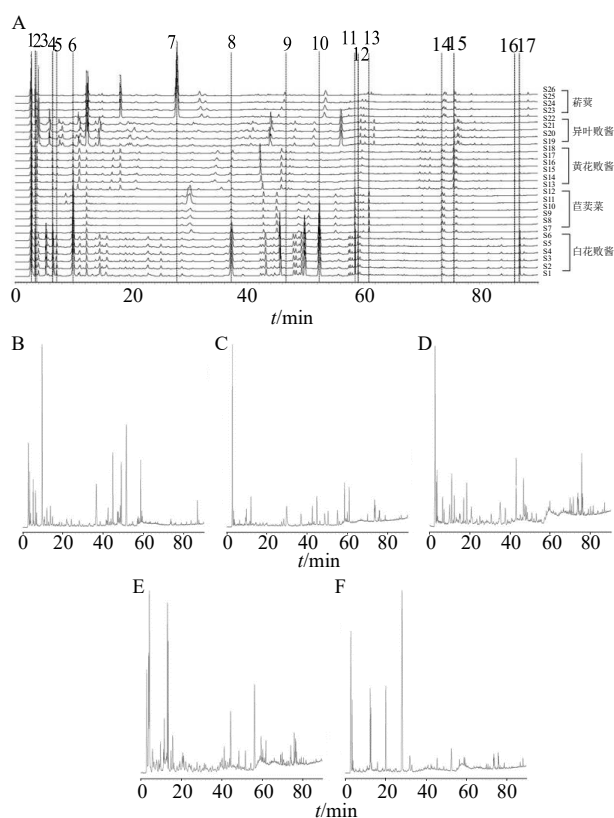


图 3 败酱草及其混伪品总皂苷得率比较

Fig. 3 Comparison of the yields of total saponins from *Herba Patriniae* and its adulterants



1-熊果苷, 15-常春藤皂苷元, 16-齐墩果酸, A-叠加图谱, B-白花败酱, C-苣荬菜, D-黄花败酱, E-异叶败酱, F-葎苣。

1-arbutin, 15-ivy saponin, 16-oleanolic acid, A-overlay atlas, B-*Patrinia villosa*, C-*Sonchus arvensis*, D-*Patrinia scabiosaefolia*, E-*Patrinia heterophylla*, F-*Thlaspi arvense*。

图 4 败酱草及其混伪品样品 HPLC 叠加图谱及对照图谱
Fig. 4 HPLC overlay atlas and comparative atlas of *Herba Patriniae* and its adulterants

11~16 号峰, 如图 4-A 所示。同时通过与对照比对, 指认其中 3 个成分, 确认 1 号峰为熊果苷, 15 号峰为常春藤皂苷元, 16 号峰为齐墩果酸。其中 1 号峰

在 白花败酱 中占比最高, 15 号峰在 异叶败酱 中占比最高, 16 号峰仅在 黄花败酱、白花败酱 中存在。共有峰中, 3 号峰在 异叶败酱 中占比显著高于其他样品, 9 号峰在 黄花败酱 中占比显著高于其他样品, 11 号峰在 白花败酱 中占比显著高于其他样品, 13 号峰在 苣荬菜 中占比显著高于其他样品, 3、4、14 号峰在部分混伪品中均有缺失。5 号峰、10 号峰仅在 白花败酱、黄花败酱 中存在且在 白花败酱 中占比显著高于 黄花败酱, 6、8、17 号峰在 白花败酱 中占比显著高于其他样品, 7 号峰仅在 葎苣 中存在。败酱草及其混伪品的指纹图谱存在着显著差异, 因此 HPLC 指纹图谱可作为一种鉴别败酱草正伪品种的有效手段。各样品色谱图中均存在 1 号峰(熊果苷), 其与邻峰的分离度较好, 峰形较佳, 且峰面积较大, 故选择该峰作为参考峰(S), 计算得出 26 批样品共有峰相对峰面积的 RSD 为 28.19%~188.06%。败酱草及其混伪品共有峰相对峰面积的 RSD 值差异较大, 表明败酱草及其混伪品样品同一化学成分含量差异较大。由指纹图谱可知 白花败酱 各化学成分最为丰富, 且各成分含量也较高。

3.5 败酱草及其混伪品指纹图谱相似度分析

将 26 批样品图谱导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件进行分析处理, 试验过程中发现 S1 图谱出峰多且成分含量较高, 故以 S1 号 白花败酱 样品的指纹图谱为参照图谱, 进行自动匹配, 并对所有的 HPLC 指纹图谱全谱进行相似度计算, 结果如表 4 所示。26 批样品的相似度差异较大, 习用品和混用品相似度在 0.137~0.644, 可见 5 种样品差异较大, 该指纹图谱可对其进行鉴别区分。

表 4 败酱草及其混伪品样品相似度评价

Table 4 Similarity evaluation table of *Herba Patriniae* and its adulterants

编号	相似度	编号	相似度
S1	1.000	S14	0.349
S2	0.724	S15	0.320
S3	0.980	S16	0.326
S4	0.983	S17	0.337
S5	0.922	S18	0.354
S6	0.920	S19	0.108
S7	0.393	S20	0.172
S8	0.403	S21	0.100
S9	0.393	S22	0.145
S10	0.394	S23	0.144
S11	0.350	S24	0.142
S12	0.342	S25	0.137
S13	0.343	S26	0.138

3.6 败酱草及其混伪品指纹图谱聚类分析

以败酱草及其混伪品 11 个共有峰的面积变量, 导入 SPSS 25.0 软件, 采用组间连接聚类方法, 以平方欧式距离为度量标准进行系统聚类分析^[18], 结果如图 5 所示。当欧式距离为 2 时, 败酱草及其混伪品可分为 6 类, 苣荬菜 (S7~S12) 样品聚为第 1 类, 荜苣菜 (S23~S26) 样品聚为第 2 类、黄花败酱 (S13~S18) 样品聚为第 3 类、白花败酱 (S1~S6) 样品聚为第 4 类、异叶败酱 (S19、S21、S22) 样品聚为第 5 类, 异叶败酱 (S20) 聚为第 6 类, 证明 5 种样品之间可以明确区分鉴别, 与相似度分析结果一致。其中, 欧式距离 > 5 时, Group I~III 可聚为一类, 表现出较近的亲缘关系, 苣荬菜、荜苣菜、黄花败酱的化学成分及含量具有一定的相似性, 提示苣荬菜、荜苣菜可能有部分药理活性与黄花败酱类似, 值得深入研究。

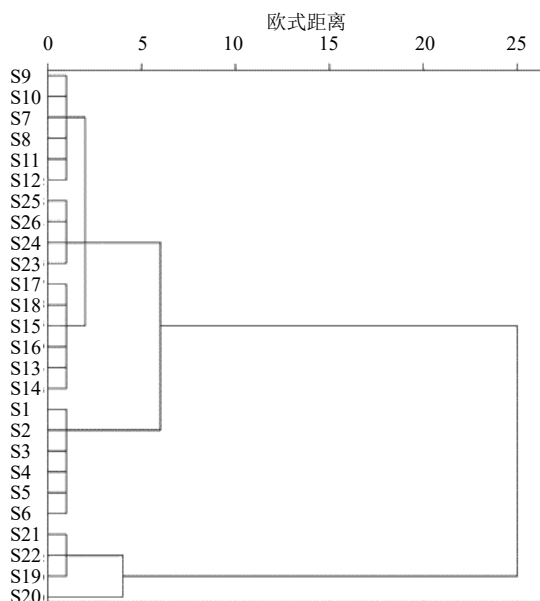


图 5 败酱草及其混伪品样品聚类分析图
Fig. 5 Cluster analysis of *Herba Patriniae* and its adulterants

3.7 败酱草及其混伪品指纹图谱的主成分分析和综合评价研究

通过 SPSS 25.0 软件对 26 批样品 HPLC 指纹图谱的 11 个共有特征峰峰面积进行数据处理, 采用降维、因子分析, 以回归方法, 计算主成分特征值和方差贡献率, 结果见表 5, 得到主成分因子载荷矩阵, 结果如表 6 所示。主成分特征值和方差贡献率是选择主成分的依据, 载荷矩阵反映了各变量对主成分的重要程度^[19-20]。以特征值 > 1 为标准, 得到 3

表 5 败酱草及其混伪品样品主成分特征值和方差贡献率

Table 5 Principal component characteristic value and variance contribution rate of *Herba Patriniae* and its adulterants

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	4.746	43.148	43.148
2	2.996	27.237	70.385
3	2.018	18.349	88.734

表 6 败酱草及其混伪品样品主成分因子载荷矩阵
Table 6 Principal component factor load matrix of *Herba Patriniae* and its adulterants

峰号	成分 1	成分 2	成分 3
1	0.867	-0.216	-0.139
2	0.855	0.202	0.082
3	-0.441	0.796	-0.399
4	0.472	0.819	-0.074
9	-0.447	0.028	0.873
11	0.931	0.140	-0.114
12	0.857	0.215	-0.280
13	-0.075	-0.638	-0.630
14	0.211	-0.955	0.139
15	-0.805	0.395	-0.173
16	0.591	0.252	0.726

个主成分, 其中主成分 F1、F2、F3 的贡献率分别为 43.15%、27.24%、18.35%, 累计贡献率为 88.73%, 表明可以反映样品大部分的信息, 可作为败酱草及其混伪品成分的评价指标。主成分因子载荷矩阵表中, 峰 1 (熊果苷)、2、11、12、15 (常春藤皂苷元) 在主成分 1 上有较高载荷, 说明主成分 1 主要反映这 5 个成分指标信息; 同理, 主成分 2 主要反映峰 3、4、13、14 这 4 个成分指标的信息; 主成分 3 主要反映峰 9、16 (齐墩果酸) 这 2 个成分指标的信息。以 3 个主要成分建立坐标系, 绘制败酱草及其混伪品的得分图, 如图 6 所示, 表明败酱草及其混伪品的质量存在一定的差异, 可将 26 批样品分为 5 群, 其分析结果与聚类分析结果一致。

采用 3 个主成分得分情况, 以各主成分对应的方差贡献率为权重, 按照公式 $F = 0.43148 F_1 + 0.27237 F_2 + 0.18349 F_3$, 计算综合得分及排名, 如表 7 所示。结果表明白花败酱样品中 1 (熊果苷)、2、3、4、11、12 等含量较高, 且综合得分为 1.85, 在各样品中位居第 1 位, 表明白花败酱质量最好。而苣荬菜不仅各成分含量低, 且综合得分垫底, 表明苣荬菜质量较差。败酱草及其混伪品样品主成分得分之间具有一定差异, 表明这些成分与药材质量存在着一定相关性, 可以反映败酱草及其混伪品的差异性, 为败酱草及其混伪品的鉴别提供更有力的参考依据。

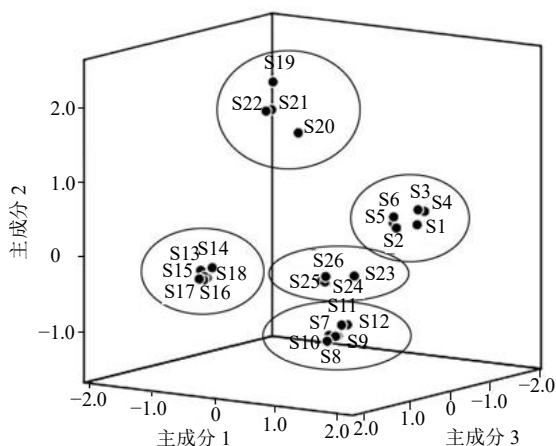


图 6 败酱草及其混伪品样品主成分分析得分图

Fig. 6 Principal component analysis scores of *Herba Patriniae* and its adulterants

表 7 败酱草及其混伪品主成分得分、综合得分

Table 7 Principal component scores and comprehensive scores of *Herba Patriniae* and its adulterants

样品	主成分 1	主成分 2	主成分 3	综合得分	排名
白花败酱	3.56	1.07	0.14	1.85	1
黄花败酱	-1.38	-0.29	2.34	-0.24	2
异叶败酱	-2.64	2.94	-1.28	-0.57	4
菥蓂	0.05	-0.78	-0.59	-0.30	3
菥蓂菜	-0.46	-2.22	-1.23	-1.03	5

4 讨论

本研究采用的生药学鉴定、单因素实验法、响应面法优化提取工艺、HPLC 指纹图谱法等研究方法，已被广泛应用于各领域的科学研究，其稳定性和可靠性已被认可。虽然目前已有部分关于败酱草及其混伪品鉴别的研究，如罗霄等^[21]、周宝玉等^[22]均对败酱草的鉴别有一定的研究，但基本使用的是传统的生药学鉴别方法，且大多局限于性状特征，对败酱草及其混伪品的显微特征及药效物质基础研究甚少。而在败酱草总皂苷的提取工艺优化及指纹图谱建立方面，研究主要集中于败酱草而未与混伪品结合研究^[23]。败酱草及其混伪品饮片为干品，部分特征缺失，所以性状鉴定的难度很大，准确性偏低。显微鉴别研究发现，败酱草与其他 3 种混伪品在粉末的组织结构、细胞性状或内含物类型基本相似，但之间仍存在差异和一些特殊结构。传统的鉴定方法辨别难度较大，鉴定手段具有一定的主观性，HPLC 指纹图谱鉴别是一种快速有效的鉴别手段^[24-25]，可弥补传统鉴别方法的不足。本研究使用传统鉴别方法和现代技术鉴别手段相结

合，提高试验的准确性和科学性。

总皂苷作为败酱草中主要有效成分之一，其含量高低是衡量和评价败酱草质量的关键因素之一。研究发现，败酱草及其 3 种混伪品所含的化学成分复杂，但均含有总皂苷类成分，且含量不同，因此其含量可作为一个鉴定的参考。目前对败酱草皂苷类成分的药理活性研究较少，故本研究对败酱草总皂苷提取工艺进行优化，以期为后续败酱草药理作用研究提供基础。响应面试验所得的黄花败酱总皂苷得最优提取条件下总皂苷得率为 $(2.57 \pm 0.05)\%$ ，相比潘涛等^[26]在正交工艺优化下的得率 1.26%有了明显的提升，表明该工艺优化较大幅度提高了黄花败酱总皂苷的得率，为败酱草总皂苷的高效提取提供基础。此外，本实验得到的黄花败酱总皂苷仅为粗提物，其具体的单体化合物组成、成分含量及对应药理活性值得后续深入研究。

本实验聚类分析中黄花败酱、菥蓂菜和菥蓂表现出较近的亲缘关系，表明其化学成分及含量具有一定的相似性，提示菥蓂菜、菥蓂可能有部分药理活性与黄花败酱类似，且二者长期作为败酱草的代替习用品，具有一定的科学依据。本研究的开展为菥蓂菜、菥蓂的开发与利用提供了一定的技术保障，为后续菥蓂菜、菥蓂的应用研究奠定了基础，有助于对其进一步深入研究和开发。综合评价结果得出白花败酱质量最好，菥蓂菜质量较差。由以上结果可知，总皂苷得率较高的白花败酱的综合评价排名靠前，表明综合评价的结果与总皂苷的得率有一定的相关性。本研究发现，HPLC 指纹图谱可以作为一种鉴别败酱草及其混用品并评价其质量差异的方法，但药材的生长时期、生长环境、炮制方法、储存时期等均会对药材所含化学成分种类、含量造成一定的影响，因此应进一步在其他方面进行深入分析，以提高药材鉴别及临床用药的科学性。

本研究对败酱草及其市场上常见混伪品进行了鉴定，为败酱草的鉴别及完善质量标准提供了科学依据，保证了用药的准确性，故提议医药工作者应对败酱草的药源加以规范，杜绝伪品掺杂，确保临床疗效，为后续败酱草的药物资源研究开发利用提供基础保障，推动败酱草的深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈淑玲, 韩亮. 败酱草的现代研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(6): 816-821.

- [2] 杨学浩. 败酱草的品种鉴别和应用 [J]. 山西中医, 2005, 21(6): 44.
- [3] Liu Y C, Liu W, Wang J Q, et al. Phytochemical and Pharmacological review on two herbs of Baijiangcao: *Patrinia scabiosaeifolia* Fisch. ex Trev. and *Patrinia villosa* (Thunb.) Juss [J]. *Mini Rev Org Chem*, 2020, 17(5): 496-517.
- [4] Gong L N, Zou W, Zheng K Y, et al. The *Herba Patriniae* (Caprifoliaceae): A review on traditional uses, phytochemistry, pharmacology and quality control [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 265: 113264.
- [5] 陈慧心, 黄莹莹, 李子欣, 等. 败酱草及其有效成分抗结直肠癌药理作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1435-1439.
- [6] 朱彤, 江培春. 败酱草古今用 [J]. 光明中医, 2015, 30(3): 638-640.
- [7] 明·李时珍. 本草纲目-第二册: 校点本 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 1052-1053.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 1977: 349-350.
- [9] 叶冬青. 白花败酱与蕤苢的鉴别 [J]. 福建中医药, 2002, 33(3): 52.
- [10] 崔正义, 王培勤, 张美蓉. 北败酱过敏反应 1 例 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 32.
- [11] 陈淑欣, 王海英. 败酱草混用浅析 [J]. 实用中医药杂志, 2004, 20(5): 275.
- [12] 刘亚楠, 石典花, 雷留成. 金银花与山银花的 HPLC 指纹图谱鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 773-776.
- [13] 李洋, 陈健, 张越, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分含量测定的白芍药材质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 231-237.
- [14] 王容, 魏屹, 周春岚, 等. 基于指纹图谱结合化学计量法对乌头属藏药材榜那的多指标成分分析 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3037-3044.
- [15] 孔德暄, 陈运中, 朱映睿, 等. 虎杖 HPLC 指纹图谱及抗痛风性关节炎活性谱效关系研究 [J]. 中草药, 2022, 53(2): 569-574.
- [16] 宋珊珊, 包永睿, 赵焕君, 等. 白花败酱草总皂苷提取纯化工艺的优化 [J]. 中成药, 2018, 40(1): 93-96.
- [17] 黄彪, 程元柳, 曹秀君, 等. 冬虫夏草及其混淆品 HPLC 指纹图谱研究及共有成分鉴定 [J]. 中草药, 2017, 48(5): 991-996.
- [18] 陆丹, 池玉梅, 高秋芳, 等. 虎掌南星 HPLC 指纹图谱建立 [J]. 中成药, 2020, 42(10): 2788-2791.
- [19] 邱俊娜, 张榆, 张双, 等. 基于 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别及定量测定的夏枯草质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2842-2850.
- [20] 冯冰薇, 陈淑娜, 成秋香, 等. 化学模式识别结合指纹特征图谱与三萜酸含量测定探讨茯苓质量与产地的关系 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(10): 1506-1512.
- [21] 罗霄, 代琪, 杨小艳, 等. 败酱草与混淆品种标准研究 [J]. 中国药品标准, 2018, 19(5): 330-335.
- [22] 周宝玉, 虞文妹. 败酱草与其混淆品苏败酱及北败酱的鉴别 [J]. 实用中医药杂志, 2014, 30(8): 778-779.
- [23] 刘素香, 刘毅, 白雪, 等. 败酱草指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2074-2077.
- [24] Huang W, Pan Y, Jiang H J, et al. A comprehensive quality evaluation method of *Corydalis yanhusuo* by HPLC fingerprints, chemometrics, and correlation analysis [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(10): 2054-2064.
- [25] Wu C, Xu B, Li Z J, et al. Gender discrimination of *Populus tomentosa* barks by HPLC fingerprint combined with multivariate statistics [J]. *Plant Direct*, 2021, 5(3): e00311.
- [26] 潘涛, 欧阳波. 正交设计法优选黄花败酱总皂苷提取工艺 [J]. 中国医药导报, 2009, 6(33): 49-50.

[责任编辑 时圣明]