UHPLC-MS/MS 法结合化学计量学分析姜味草中的多指标成分

王 梦[1,2,3]，田 伟[1,2,3]，甄亚钦[1,2,3]，吴玲芳[1,2,3]，李军山[4]，牛丽颖[1,2,3]*

（1. 河北中医学院，河北石家庄 050091；2. 河北省中药配方颗粒技术创新中心，河北石家庄 050091；
3. 中药材品质评价与标准化河北省工程研究中心，河北石家庄 050091；4. 神威药业集团有限公司，河北石家庄 051430）

摘要：建立了超高效液相色谱串联质谱（UHPLC-MS/MS）法同时测定姜味草（**1**）药材中 14 个活性成分，即新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸 A、芦丁、木犀草苷、异槲皮苷、迷迭香酸、香叶木苷、阿魏酸、野黄芩苷、木犀草素 -7-*O*-β-D- 葡萄糖醛酸苷和蒙花苷。色谱柱采用 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm），流动相 A 为乙腈，B 为 0.1％甲酸溶液，线性梯度洗脱，流速为 0.4 ml/min，柱温为 35 ℃，进样量为 2 μl。采用电喷雾离子源（ESI），多反应监测模式（MRM）。并结合聚类分析、主成分分析和正交偏最小二乘法 - 判别分析评价不同批次 **1** 药材的差异。结果显示，14 个活性成分的线性关系、精密度、稳定性、重复性及加样回收率等均符合要求。化学计量学分析结果表明，云南和四川 2 个产地的 **1** 药材中，14 个活性成分存在一定差异，其中迷迭香酸和蒙花苷为主要差异性成分。建立的 UHPLC-MS/MS 法准确、快速、简单、灵敏度高，为 **1** 药材的质量控制提供了参考。

关键词：姜味草；超高效液相色谱串联质谱；活性成分；含量测定；质量评价

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255（2022）07-1027-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.015

Analysis of Multi-index Components in *Herba Micromeriae biflorae* by UHPLC-MS/MS Combined with Chemometrics

WANG Meng[1,2,3], TIAN Wei[1,2,3], ZHEN Yaqin[1,2,3], WU Lingfang[1,2,3], LI Junshan[4], NIU Liying[1,2,3]*

(*1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091; 2. Hebei TCM Formula Granule Innovation Center, Shijiazhuang 050091;
3. Hebei TCM Quality Evaluation & Standardization Engineering Research Center, Shijiazhuang 050091;
4. Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shijiazhuang 051430*)

ABSTRACT: An ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method was established for the simultaneous determination of fourteen active ingredients, including neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, isochlorogenic acid A, rutin, cynaroside, isoquercitrin, rosmarinic acid, diosmin, ferulic acid, scutellarin, luteolin-7-*O*-β-D-glucuronide and linarin, in *Herba Micromeriae biflorae* (**1**). The Acquity UPLC BEH C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used, and the analysis was carried out in the linear gradient elution mode with acetonitrile as mobile phase A and 0.1％ formic acid solution as mobile phase B. The flow rate was 0.4 ml/min, the column temperature was 35 ℃ and the injection volume was 2 μl. The electron spray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used, and combined with cluster analysis, principal component analysis and orthogonal partial least squares-discriminant analysis to evaluate the differences of different batches of **1**. The results showed that the linear relationship, precision, stability, repeatability and sample recovery of the fourteen compounds were all met the requirements. The chemometric analysis results showed that there were certain differences of the fourteen compounds in **1** from two origins in Yunnan and Sichuan, among which rosmarinic acid and linarin were the main differential components. The established UHPLC-MS/MS method is accurate, rapid, simple and highly sensitive, which provides a reference for the quality control of **1**.

Key Words: *Herba Micromeriae biflorae*; UHPLC-MS/MS; active ingredient; content determination; quality evaluation

姜味草（*Herba Micromeriae Biflorae*，**1**）是唇形科姜味草属多年生草本植物[1]，又名小姜草、胡椒草、生地姜、小香草、小香薷等[2—3]，为彝族地区习用药材，在我国主要分布于云南东北部和中部至东南部，贵州和四川等地也有分布[4]，主要以全草入药，具有温中健胃、祛风散寒除湿的功效，常用于治疗感冒风寒、消化不良、腹胀、胸闷疼痛、腹胀痛、急性胃炎、呕吐、痞块疼痛等症[5]。**1** 很早就记载于各地的植物志及中药学专著中[1,6]，如《滇南本草》《中药行性经验鉴别法》《全国中草药汇编》《云南中草药》《中华本草》《中药大辞典》《中国彝族药学》等，现收录于《云南省中药材标准》2005 年版[7]，收录薄层鉴别、性状鉴别项，但均缺少含量测定项。

目前已有研究测定 **1** 中的活性成分，但大多局限于挥发性化学成分[8—13]。**1** 的用药方式为水煎，因而水溶性成分即非挥发性化学成分发挥了重要治疗作用。为了寻找姜味草的有效成分以及建立 **1** 药材的质量控制方法，本课题组前期采用超高效液相色谱 - 电喷雾 / 四极杆飞行时间串联质谱（UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS）法采集数据，对 **1** 的非挥发性化学成分进行定性分析，最终筛选出成分明确且结合文献报道具有药理活性的 14 种成分，分别为新绿原酸（neochlorogenic acid，**2**）、绿原酸（chlorogenic acid，**3**）、隐绿原酸（cryptochlorogenic acid，**4**）、咖啡酸（caffeic acid，**5**）、异绿原酸 A（isochlorogenic acid A，**6**）、芦丁（rutin，**7**）、木犀草苷（cynaroside，**8**）、异槲皮苷（isoquercitrin，**9**）、迷迭香酸（rosmarinic acid，**10**）、香叶木苷（diosmin，**11**）、阿魏酸（ferulic acid，**12**）、野黄芩苷（scutellarin，**13**）、木犀草素 -7-*O*-β-D- 葡萄糖醛酸苷（luteolin-7-*O*-β-D-glucuronide acid，**14**）和蒙花苷（linarin，**15**）。现代药理学研究表明，**7**、**8**、**9**、**11**、**13**、**14**、**15** 为黄酮类化合物，具有抗炎、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等作用[14—15]，**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**10**、**12** 为有机酸类化合物，具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌等活性[16—18]，可见这些成分的药理活性与 **1** 的功效相符[7]，推测这些成分是 **1** 发挥临床疗效的物质基础，因此对这些成分进行含量测定研究，对于 **1** 的质量控制及保障药材稳定性具有重要意义。

目前已有关于 **1** 中化学成分含量测定的研究，但只是对其中齐墩果酸和熊果酸进行测定，且大多采用 HPLC 法[19—20]，测定时间长、检测灵敏度较差。为解决上述问题，本研究采用灵敏度、选择性和精确度更高的超高效液相色谱串联质谱（UHPLC-MS/MS）法测定 **1** 中 14 个主要活性成分含量，以期为 **1** 的质量控制和临床应用提供科学的参考依据。

1　仪器与试药

LC-30A 型超高效液相色谱仪（日本岛津公司）；4500 QTRAP 型三重四极杆线性离子阱质谱仪（美国 AB 公司）；BSA224S-CW 型万分之一电子分析天平和 CPA225D 型十万分之一电子分析天平均购于赛多利斯科学仪器北京有限公司。

15 批 **1** 药材（批号 2009101 ～ 2009106、2009111 ～ 2009116、2009121 ～ 2009123，分别编号为 S1 ～ S15；其中 S1 ～ S3 产自云南华宁县、S4 ～ S6 产自云南禄丰市、S7 ～ S9 产自云南石林县、S10 ～ S12 产自四川都江堰市、S13 ～ S15 产自四川双流县）均为神威药业集团有限公司提供，经楚雄彝族自治州中医医院余惠祥副主任医师鉴定为唇形科植物 **1** 的干燥全草；**2**（含量 98%，批号 MUST-12113001）、**4**（含量 98%，批号 MUST-13013002）、**13**（含量 98.74%，批号 MUST-16030406）、**11**（含量 98.0%，批号 PS020083）和 **14**（含量 97.0%，批号 PS1835-0025MG）的对照品均购于成都曼斯特生物技术有限公司；**3** 对照品（南京普怡生物科技有限公司，含量 99.96%，批号 PY20170216）；**5**（含量 100.0 %，批号 110885-200102）、**7**（含量 91.7%，批号 111809-201804）、**8**（含量 99.3%，批

收稿日期：2021-10-08

基金项目：中央引导地方科技发展资金项目（206Z2501G）、河北省重点研发计划项目（20372502D）、河北省自然科学基金资助项目（H2019423050）、河北省中医药管理局项目（2022363）、云南省重大科技专项计划（202102AA310027）

作者简介：王　梦（1986—），女，硕士研究生，专业方向：中药质量控制。

通信作者：牛丽颖（1968—），女，教授，博士生导师，从事中药分析及药效物质基础研究。

E-mail：niuliyingyy@163.com

号 11720-201106)、**9**(含量 97.2%，批号 111809-201804)、**10**(含量 98.0%，批号 111820-201404)、**12**(含量 99.0%，批号 110773-201614) 和 **15**(含量 97.50%，批号 111528-201509) 对照品均购于中国食品药品检定研究院；**6** 对照品(成都德斯特生物技术有限公司，含量 99%，批号 DST-180130-037)；乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯，其他试剂均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱条件：色谱柱 Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm×100 mm，1.7 μm)，流动相 A 为乙腈，B 为 0.1%甲酸溶液，线性梯度洗脱 (0—5 min，A 5%—11%；5—10 min，A 11%—13%；10—13 min，A 13%；13—25 min，A 13%—18%；25—27 min，A 18%—25%；27—30 min，A 25%—88%；30—35 min，A 88%—95%)，每次进样前预平衡 5 min，再进行洗脱程序；流速 0.4 ml/min；柱温 35 ℃；进样量 2 μl。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源 (ESI)，多反应监测模式 (MRM)，正负离子切换检测；源喷射电压 (IS) 正离子模式为 5 500 V，负离子模式为 −4 500 V；离子源温度 550 ℃；雾化气 (N_2) 压力 345 kPa；辅助气 (N_2) 压力 345 kPa；气帘气 (N_2) 压力 241 kPa，接口加热，全程通入氮气；**2** ～ **15** 的监测离子对、解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 1。

2.2 溶液配制

对照品溶液：精密称取 **2** ～ **15** 对照品，分别加入甲醇，制得 **2** ～ **15** 对照品贮备液；精密量取各单一对照品贮备液适量，置同一量瓶中，加 50% 甲醇稀释并定容，摇匀即得每 1 ml 中含 **2** ～ **15** 分别为 0.038、0.112、0.630、0.551、0.064、0.056、0.051、0.039、5.315、0.072、0.071、3.848、2.108、4.037 μg 的混合对照品溶液。

供试品溶液：取 **1** 药材粉末约 0.1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 50 ml，密塞，精密称定，超声处理 60 min，放冷，再精密称定，用 50%甲醇补足减少的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

表 1 14 个活性成分的质谱条件

Tab.1 Mass Spectrometry Conditions of Fourteen Active Ingredients

化合物	相对分子质量	母离子 MS_1 (m/z)	子离子 MS_2 (m/z)	DP/V	CE/eV
2	354.10	352.8[M－H]$^-$	190.7	－79	－31
3	354.10	352.7[M－H]$^-$	190.6	－79	－31
4	354.10	352.8[M－H]$^-$	172.4	－60	－25
5	180.04	178.5[M－H]$^-$	134.5	－74	－21
6	516.45	515.0[M－H]$^-$	352.6	－130	－21
7	610.15	609.0[M－H]$^-$	299.9	－145	－48
8	448.10	447.2[M－H]$^-$	284.1	－124	－41
9	464.10	463.0[M－H]$^-$	299.6	－141	－35
10	360.08	358.9[M－H]$^-$	196.6	－102	－27
11	608.17	607.0[M－H]$^-$	298.3	－180	－37
12	194.06	192.8[M－H]$^-$	133.2	－90	－18
13	462.08	461.1[M－H]$^-$	284.4	－140	－46
14	462.08	460.9[M－H]$^-$	284.7	－144	－31
15	592.18	593.0[M+H]$^+$	285.1	128	42

2.3 专属性试验

取“**2.2**”项下混合对照品溶液和供试品溶液 (**1** 药材编号 S1)，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果见图 1，在该色谱质谱条件下，**2** ～ **15** 均能有效分离，峰形对称，说明方法专属性良好。

2.4 线性试验

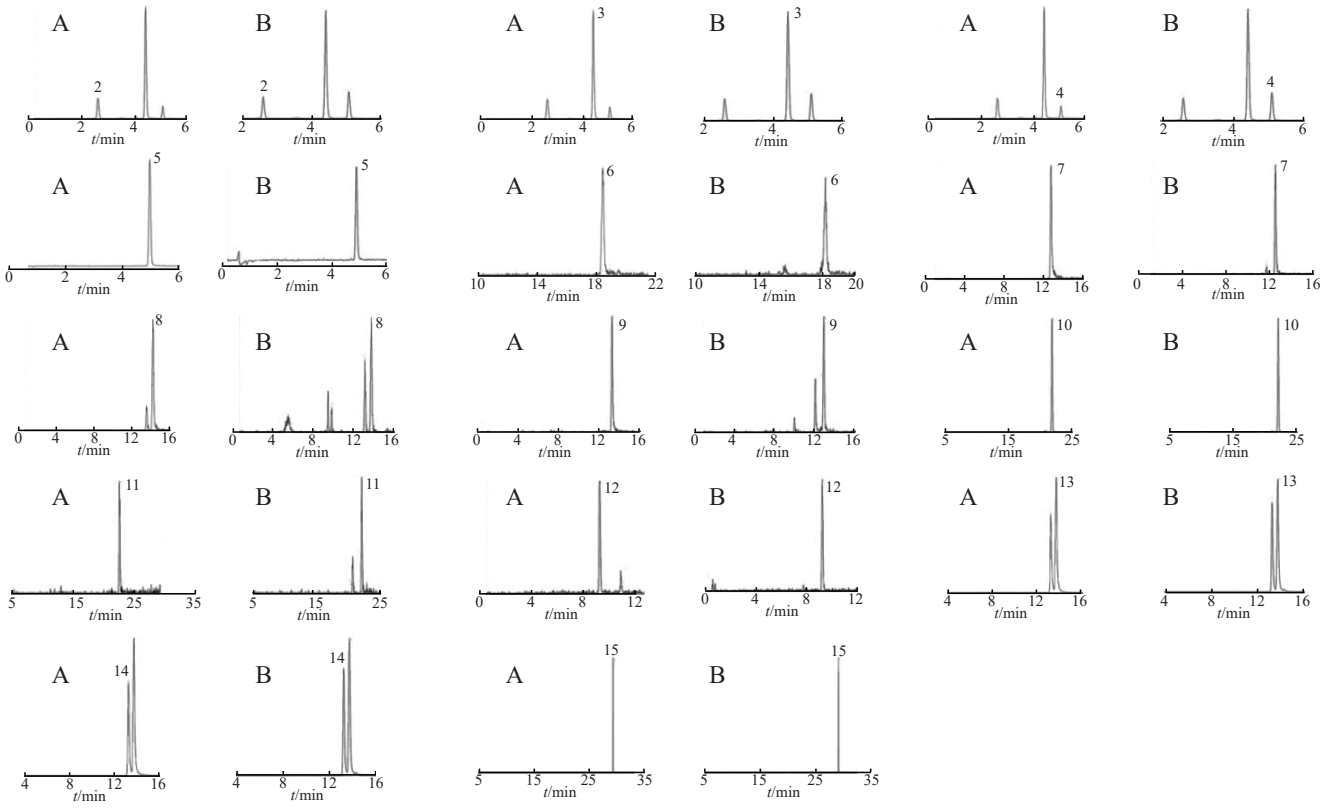
精密量取“**2.2**”项下混合对照品溶液 0.5、1.25、2.5、3.75、5 ml，分别置 10 ml 量瓶中，用 50%甲醇稀释并定容，摇匀，即得系列浓度线性试验溶液。分别精密吸取“**2.2**”项下混合对照品溶液及上述系列浓度线性试验溶液各 2 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析，以质量浓度 (c) 为横坐标、峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归。结果见表 2，**2** ～ **15** 在相应浓度范围内线性关系良好。

2.5 检测限与定量限

取“**2.2**”项下混合对照品溶液，加 50%甲醇逐倍数进行稀释，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，以色谱峰信噪比为 3 ∶ 1 时相应的浓度为该化合物的 LOD，信噪比为 10 ∶ 1 时相应的浓度为该化合物的 LOQ。**2** ～ **15** 的 LOD 和 LOQ 结果见表 1。

2.6 精密度试验

取“**2.2**”项下混合对照品溶液 5 ml，置 10 ml



A：混合对照品溶液，B：供试品溶液

2 ～ 15 - **2** ～ **15**

图 1　典型色谱图

Fig.1　Typical Chromatograms

表 2　14 个活性成分的回归方程、线性范围、检测限（LOD）及定量限（LOQ）

Tab.2　Regression Equations, Linear Ranges, LODs and LOQs of Fourteen Active Ingredients

化合物	线性回归方程	R^2	线性范围/mg·L^{-1}	LOD/ng·ml^{-1}	LOQ/ng·ml^{-1}
2	A=5.18×10^6c - 1.98×10^3	0.999 1	0.002～0.038	0.151	0.452
3	A=7.21×10^6c+5.76×10^3	0.999 5	0.006～0.112	0.146	0.447
4	A=8.72×10^5c - 7.80×10^3	0.997 6	0.031～0.630	0.255	1.680
5	A=2.17×10^7c+1.60×10^5	0.999 1	0.028～0.551	1.836	2.755
6	A=1.39 ×10^6c+1.18×10^3	0.995 9	0.003～0.064	0.212	0.643
7	A=3.15×10^6c+8.97×10^2	0.998 4	0.003～0.056	0.118	0.555
8	A=2.60×10^6c+9.97×10^2	0.997 4	0.003～0.051	0.062	0.202
9	A=3.41×10^6c+1.05×10^3	0.999 8	0.002～0.039	0.120	0.385
10	A=3.03×10^6c - 1.88×10^5	0.999 6	0.266～5.315	3.430	10.630
11	A=5.58×10^5c+3.37×10^2	0.999 7	0.004～0.072	0.228	0.716
12	A=1.40×10^6c+2.11×10^2	0.999 4	0.004～0.071	0.711	2.132
13	A=7.65×10^5c+1.90×10^4	0.998 8	0.192～3.848	2.498	7.696
14	A=4.64×10^6c - 2.93×10^3	0.999 2	0.105～2.108	1.378	4.217
15	A=3.63×10^6c+3.17×10^5	0.998 3	0.202～4.037	0.414	1.346

量瓶中，用 50%甲醇定容，摇匀后，精密吸取 2 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件连续测定 6 次，计算得 **2** ～ **15** 的峰面积 RSD（n=6）均在 1.0%～ 3.7%，表明仪器精密度良好。

2.7　稳定性试验

取 **1** 药材（编号 S1），按“**2.2**”项下方法制备

供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、19 h 后，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析，计算得 **2** ～ **15** 峰面积 RSD（*n*=6）均在 1.5%～ 3.8%，说明供试品溶液在 19 h 内基本稳定。

2.8 重复性试验

取 **1** 药材（编号 S1），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，共 6 份，精密吸取各供试品溶液 2 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析，计算 **2** ～ **15** 含量的 RSD（*n*=6）均在 0.8%～ 2.8%，表明方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取 **1** 药材（编号 S1）共 9 份，每份约 0.05 g，每 3 份为 1 组，每组精密加入 **2** ～ **15**，加入的量相当于 **1** 药材中各对照品含量的 50%、100%、150%，按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，精密吸取各供试品溶液 2 μl，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析，计算 14 种被测成分的平均回收率。结果显示，**2** ～ **15** 的平均回收率（*n*=9）为 95.0%～ 104.0%，RSD 为 1.1%～ 3.0%，表明方法准确度良好。

2.10 样品测定

取 15 批 **1** 药材，按“**2.2**”项下方法分别制备供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样分析，根据标准曲线方程计算样品中各成分的含量，结果见表 3。不同批次的 **1** 中，**10** 的含量最高；产自云南的 **1** 药材中被测成分的含量大多高于产自四川的 **1** 药材。

2.11 化学计量学分析

2.11.1 聚类分析

为进一步直观比较不同批次 **1** 的差异，采用化学计量学方法，以测定的 14 种成分的峰面积作为变量，导入 SPSS 26.0 软件进行分析，采取组间连接法，依据平方欧氏距离为测度进行聚类分析。结果见图 2，当 15< 组间距离 <25 时，S1 ～ S9（云南产地）聚为一类，S10 ～ S15（四川产地）聚为一类。

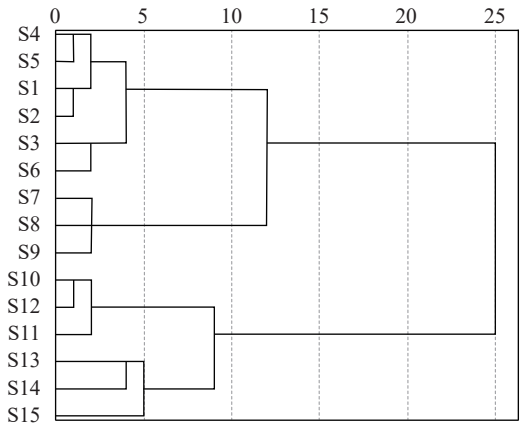


图 2 15 批 1 的聚类树状图

Fig.2 Dendrogram of Fifteen Batches of **1**

表 3 样品含量测定结果 /mg·g^{-1}

Tab.3 Content Determination Results of Samples/mg·g^{-1}

药材编号	14个主要活性成分														总量
	2	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	
S1	0.010	0.029	0.124	0.036	0.010	0.011	0.007	0.008	1.854	0.019	0.018	0.839	0.427	1.030	4.422
S2	0.016	0.018	0.158	0.033	0.011	0.015	0.006	0.005	1.821	0.017	0.016	0.741	0.381	1.164	4.402
S3	0.011	0.019	0.220	0.034	0.015	0.025	0.005	0.006	1.845	0.017	0.011	0.751	0.593	1.094	4.646
S4	0.012	0.032	0.189	0.036	0.018	0.023	0.007	0.008	1.670	0.027	0.022	0.521	0.444	1.129	4.138
S5	0.011	0.034	0.185	0.040	0.018	0.022	0.007	0.008	1.639	0.027	0.023	0.521	0.444	1.129	4.108
S6	0.012	0.011	0.209	0.037	0.010	0.028	0.005	0.006	2.047	0.024	0.019	0.896	0.565	1.240	5.109
S7	0.012	0.027	0.155	0.051	0.005	0.008	0.006	0.007	2.442	0.019	0.014	0.834	0.424	1.010	5.014
S8	0.013	0.011	0.207	0.044	0.003	0.027	0.011	0.007	2.589	0.020	0.025	0.993	0.496	1.115	5.561
S9	0.015	0.012	0.231	0.042	0.005	0.023	0.009	0.007	2.349	0.014	0.026	0.989	0.572	1.057	5.351
S10	0.009	0.019	0.119	0.032	0.009	0.004	0.007	0.006	1.629	0.014	0.022	1.026	0.394	0.666	3.956
S11	0.010	0.016	0.117	0.029	0.005	0.002	0.008	0.005	1.500	0.019	0.021	0.667	0.368	0.853	3.620
S12	0.010	0.017	0.131	0.029	0.003	0.006	0.015	0.005	1.490	0.010	0.017	0.986	0.415	0.740	3.874
S13	0.008	0.014	0.127	0.028	0.005	0.002	0.007	0.007	1.144	0.014	0.027	0.639	0.454	0.729	3.205
S14	0.009	0.017	0.136	0.028	0.006	0.003	0.006	0.005	1.225	0.012	0.020	0.568	0.540	0.461	3.036
S15	0.007	0.012	0.100	0.025	0.005	0.007	0.006	0.006	0.846	0.015	0.023	0.442	0.412	0.505	2.411

2.11.2　主成分分析

在聚类分析的基础上，进一步对 15 批 **1** 药材进行主成分分析。将 **2** ～ **15** 的峰面积导入 SIMCA-P14.1 软件，主成分分析结果见图 3。综合聚类分析和主成分分析结果，15 批 **1** 样品归为两类：云南产地和四川产地；提示建立的分析方法能够对不同产地的 **1** 药材进行区分比较和质量控制。

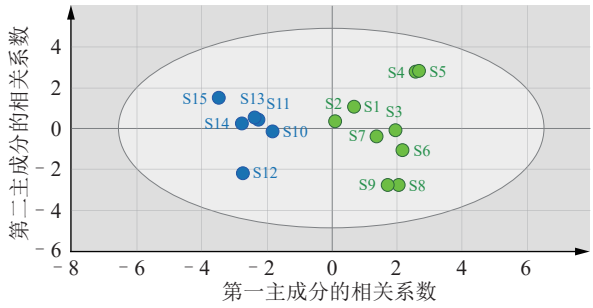


图 3　15 批 1 的主成分分析得分图

Fig.3　Principal Component Analysis Scores of Fifteen Batches of **1**

2.11.3　正交偏最小二乘法判别分析

为找寻不同产地产物中的差异性成分，采用 SIMCA-P14.1 软件进行正交偏最小二乘法判别分析，得分散点图见图 4。由图 4 可知，模型参数 R^2_X 为 0.892，R^2_Y 为 0.928，Q^2 为 0.878，表明该预测模型可用于区分不同批次的 **1** 药材。

提取模型中 14 种成分的投影重要性（VIP）值，结果见图 5。以 VIP>1 为标准，筛选出 **10** 和 **15** 为主要差异性成分[21]。

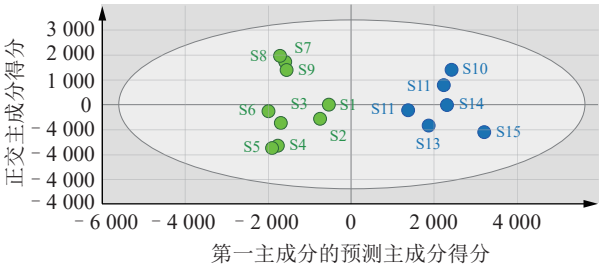


图 4　正交偏最小二乘法判别分析得分散点图

Fig.4　Score Scatter Plots of Orthogonal Partial Least Squares

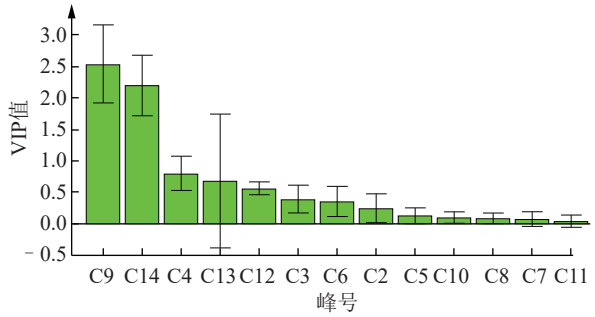


图 5　15 批 1 在正交偏最小二乘法判别分析模型中共有峰的 VIP 值

Fig.5　VIP Values of Common Peaks in Orthogonal Partial Least Squares Model of Fifteen Batches of **1**

3　讨论

3.1　评价指标的选择

目前关于 **1** 中所含化学成分的较系统的研究尚不多见，并且主要集中在挥发性成分的提取方法及成分分析[10—13]，对于非挥发性成分的研究甚少。而水溶性成分即非挥发性化学成分是药效发挥的重要物质基础，因此本试验选取非挥发性黄酮类及有机酸类作为评价指标，同时查阅相关文献发现黄酮类化合物具有抗炎、抗衰老、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节等药理作用[14—15]，有机酸类化合物具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌等活性[16—18]，对这些成分进行含量测定可完善 **1** 的化学物质基础，拓展药用价值。

3.2　质谱条件的优化

待分析化合物中，**2**、**3**、**4**、**5**、**6**、**10**、**12** 为有机酸，**7**、**8**、**9**、**11**、**13**、**14**、**15** 为含有多个酚羟基的黄酮类化合物，易在负离子模式下生成稳定的［M－H］⁻准分子离子峰，因此采用负离子模式扫描。但在此条件下，**15** 的灵敏度不高，将 **15** 采用正离子模式扫描，其响应及灵敏度均明显提高。采用外接针泵进样的方式优化各待测物质的质量调谐参数、簇电压，以响应最强时的参数作为最优质谱条件。

3.3　流动相的选择

黄酮类及有机酸类物质的极性较大，且 **13** 和

14 及 **1**、**2** 和 **3** 为同分异构体，因此考察流动相不同比例的分离效果。结果在该色谱条件下，2 组同分异构体及 14 种被测成分均达到较好的分离。

3.4 提取方法的选择

根据所测成分的溶解性，本研究在考察不同提取方法（加热回流、超声）时发现，超声提取完全可满足试验需要，且操作简单、方便快捷；考察不同提取溶剂（甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇）的结果显示，采用 50%甲醇为提取溶剂的提取效率最高；考察不同提取时间（30、45、60、90 min），结果显示提取时间为 60 min 时，提取效率较高，继续延长提取时间，提取效率无显著变化，最终选取 50%甲醇超声提取 60 min 作为最终优化条件。

本研究首次建立了 UHPLC-MS/MS 法同时测定 **1** 中 14 种成分含量，并结合化学模式识别，对不同产地的 **1** 药材进行了区分和鉴别。结果表明，云南和四川 2 个产地的 **1** 药材存在一定差异，其中 **10** 和 **15** 为主要差异性成分，可能与栽培技术、地理环境、种质来源及运输贮存等有关。建立的 UHPLC-MS/MS 法敏度高、专属性强，可为 **1** 的质量控制等相关研究提供参考。

参考文献：

[1] 兰 茂. 滇南本草: 第2卷[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1997.

[2] 云南省彝族医药研究所. 中国彝族药学[M]. 昆明: 云南民族出版社, 2004: 193-194.

[3] 云南省卫生局革命委员会. 云南中草药[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1971: 598.

[4] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志(第一卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 694.

[5] 张庆芝, 杨树德, 游 春, 等. 姜味草的的生药研究[J]. 云南中医中药杂志, 2000, **21**(1): 30-31.

[6] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草(第七册第十九卷)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 88-89.

[7] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准 一部[S]. 北京: 云南科技出版社, 2005: 358-366.

[8] 李坤平, 潘天玲, 贲永光, 等. 超声波强化溶剂提取姜味草中熊果酸和齐墩果酸[J]. 林产化学与工业, 2009, **29**(3): 111-114.

[9] 万庆家, 张庆芝, 张国发, 等. 姜味草的化学成分研究[J]. 中草药, 2005, **36**(7): 991-992.

[10] 李坤平, 潘天玲, 张莺颖, 等. 姜味草水蒸汽蒸馏和超临界CO_2提取物的化学成分研究[J]. 贵州大学学报, 2008, **25**(2): 165-167.

[11] 李振东, 黄勇斌. 黔产野生姜味草挥发性成分GC/MS分析[J]. 广东药学院学报, 2007, **23**(6): 655-657.

[12] 何仁远, 王建云, 张雯洁, 等. 姜味草挥发油的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 1993, (9): 536-537.

[13] 李坤平, 江嘉冕, 陈潮珠, 等. 气相色谱法测定姜味草挥发油中橙花醛与香叶醛[J]. 理化检验, 2011, **47**(7): 829-830.

[14] 陈 迪, 方莲花, 杜冠华. 黄酮类化合物抗肺动脉高压的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, **35**(3): 297-300.

[15] 李萌茹, 周玉枝, 杜冠华, 等. 中药黄酮类化合物抗衰老作用及其机制研究进展[J]. 药学学报, 2019, **54**(8): 1382-1391.

[16] 朱双全. 紫苏化学成分及药理学研究进展概要[J]. 生物化工, 2018, **4**(2): 148-149.

[17] 曹 雯, 张文娟, 潘金凤, 等. 迷迭香酸药理作用的研究进展[J]. 广西中医药, 2019, **42**(1): 54-58.

[18] 周 伟, 羊欢欢, 黄苏红, 等. 紫苏提取物对鲣鱼鱼柳的抗菌和抗脂质氧化作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, **8**(1): 41-49.

[19] 李坤平, 潘天玲, 袁旭江, 等. RP-HPLC测定姜味草中熊果酸和齐墩果酸的含量[J]. 中草药, 2009, **31**(6): 945-947.

[20] 万庆家, 张庆芝, 饶高雄, 等. 云南不同产地姜味草中齐墩果酸的含量测定[J]. 云南中医学院学报, 2004, **27**(4): 10-11.

[21] LIANG J, WU W Y, SUN G X, *et al*. A dynamic multiple reaction monitoring method for the multiple components quantification of complex traditional Chinese medicine preparations: *Niuhuang Shangqing* pill as an example [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1294**: 58-69.