

- [27] Silva T L, Fernandes J B, Fatima M, *et al.* New cathepsin V inhibitor from stems of *Bowdichia virgilioides*[J]. *Rev Bras Farmacogn*, 2019, 29(4): 491-494.
- [28] Peng W, Yang C Q, Zhan R, *et al.* Two new flavans from the trunk and leaves of *Horsfieldia glabra*[J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(20): 2350-2355.
- [29] Yang J, Lai J X, Kong W L, *et al.* Asymmetric synthesis of sakuranetin-relevant flavanones for the identification of new chiral antifungal leads[J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(11): 3409-3419.
- [30] 闵建华, 尚 强, 刘和平, 等. 云南松化学成分研究[J]. *中草药*, 2017, 48(18): 3693-3698.

## UPLC-ESI-MS/MS 法分析绵马贯众毒性物质基础

郑蓉慧<sup>1,2</sup>, 位翠杰<sup>2</sup>, 谢翡翡<sup>1,2</sup>, 万欣亚<sup>1,2</sup>, 梁小婕<sup>1,2</sup>, 段志文<sup>2</sup>, 孙冬梅<sup>2</sup>, 陈向东<sup>2\*</sup>  
(1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244)

**摘要:** 目的 建立 UPLC-ESI-MS/MS 法分析绵马贯众 95% 乙醇冷浸超声提取部位 (EC)、95% 乙醇加热回流提取部位 (EH)、水煎煮提取部位 (WD) 毒性物质基础。方法 分析采用 Agilent ZORBAX RRHD StableBond C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm); 流动相甲醇-0.2% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.30 mL/min; 柱温 25 °C; 加热电喷雾离子源; 正负离子扫描。采用 Compound Discover 3.3 软件结合数据库和相关文献鉴定化合物, 并通过热图聚类分析、偏最小二乘法判别分析筛选不同部位主要差异成分。结果 共鉴定出 72 个化合物, 其中间苯三酚类 22 个, 黄酮类 19 个, 苯丙素类 8 个, 萜类 6 个, 其他类 17 个, 主要毒性差异成分为黄绵马酸 AB、二去甲基伪绵马素 AA、绵马酸 PBP 等间苯三酚类化合物, 表儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶精等黄酮类化合物, 以及吡啶-3-甲醛等其他类化合物。结论 该方法可快速、全面地表征绵马贯众主要化学成分, 为其作用机制研究提供参考。

**关键词:** 绵马贯众; 毒性物质基础; UPLC-ESI-MS/MS; 热图聚类分析; 偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2025)10-3305-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.020

## Analysis of toxic material basis of *Dryopteris crassirhizoma* by UPLC-ESI-MS/MS

ZHENG Rong-hui<sup>1,2</sup>, WEI Cui-jie<sup>2</sup>, XIE Fei-fei<sup>1,2</sup>, WAN Xin-ya<sup>1,2</sup>, LIANG Xiao-jie<sup>1,2</sup>, DUAN Zhi-wen<sup>2</sup>, SUN Dong-mei<sup>2</sup>, CEHN Xiang-dong<sup>2\*</sup>

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish a UPLC-ESI-MS/MS method for analyzing the toxic material basis of 95% ethanol cold soaked ultrasonic extract (EC), 95% ethanol heated reflux extract (EH) and water decoction extract (WD) from *Dryopteris crassirhizoma* Nakai. **METHODS** The analysis was performed on a 25 °C thermostatic agilent ZORBAX RRHD StableBond C<sub>18</sub> column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.2% formic acid flowing at 0.30 mL/min, and heated electrospray ion source was adopted in positive and negative ion scanning. Compounds were identified by Compound Discover 3.3 software combined with the database and related literature, and the main differential components were screened by Heatmap cluster analysis and partial least squares discriminant analysis. **RESULTS** 72 compounds were identified (22 phloroglucinols, 19 flavonoids, 8 phenylpropanoids, 6 terpenoids and 17 other components). The main toxic differential components

收稿日期: 2025-04-23

基金项目: 2023 年佛山市自筹经费类科技创新项目 (2320001007559)

作者简介: 郑蓉慧 (2000—), 女 (土家族), 硕士生, 从事中药质量标准研究。E-mail: 3284294734@qq.com

\* 通信作者: 陈向东 (1975—), 男, 教授, 硕士生导师, 从事中药饮片、配方颗粒研究。E-mail: chenxd66@126.com

were phloroglucinols such as flavaspidic acid AB, didemethylpseudoaspidin AA and filixic acid PBP, flavonoids such as (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, cianidanol, and other compounds such as indole-3-carboxaldehyde. **CONCLUSION** This method can rapidly, effectively and comprehensively characterize the main chemical composition of *D. crassirhizoma*, and provide a reference for the study of its pharmacological mechanism.

**KEY WORDS:** *Dryopteris crassirhizoma* Nakai; toxic material basis; UPLC-ESI-MS/MS; heatmap cluster analysis; partial least squares discriminant analysis

绵马贯众为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎和叶柄残基, 其味苦, 微寒, 有小毒, 具有清热解毒、驱虫功效, 可用于治疗虫积腹痛、疮疡<sup>[1]</sup>, 含有间苯三酚类、黄酮类、萜类、苯丙素类、甾体类成分<sup>[2]</sup>, 其中间苯三酚具有抗菌<sup>[3]</sup>、抗病毒<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5]</sup>、抗疟<sup>[6]</sup>活性, 临床上广泛用于抗击流感病毒<sup>[4]</sup>、新冠病毒<sup>[7]</sup>等, 并且总多糖<sup>[8]</sup>、总多酚<sup>[9]</sup>具有抗氧化活性, 莨菪苷 A、山柰素等黄酮类成分<sup>[2]</sup>具有杀虫活性。研究表明, 绵马贯众水煎剂、不同有效部位对小鼠、鲫鱼模型均有毒性<sup>[10-12]</sup>, 但缺乏相关成分研究。

课题组前期通过小鼠经口急性毒性实验探究绵马贯众不同部位毒性, 发现该药材 95% 乙醇冷浸提取部位有毒, 而其 95% 乙醇加热回流、水煎煮提取部位无毒。基于此, 本实验采用 UPLC-MS/MS 法对绵马贯众化学成分进行分析, 从化学成分“半定量”峰面积变化的角度探讨该药材不同部位毒性差异的物质基础, 同时结合热图聚类分析、偏最小二乘法-判别分析筛选其差异性成分, 以期为后续研究提供依据。

## 1 材料

1.1 仪器 Thermo Vanquish Flex (超) 高效液相-Thermo Fisher QE 高分辨质谱联用仪, 配置加热电喷雾离子源 (HESI)、Xcalibur 4.1 工作站 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ME204E 电子天平 (万分之一)、XBR36 电子天平 (百万分之一) (瑞士 Mettler-Toledo 公司); Milli-QDirect 超纯水系统 (美国 Millipore 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HH-M8 电热恒温水浴锅 (江苏新春兰科学仪器有限公司); TC-15 套式恒温器 (2 000 mL, 海宁市新华医疗器械厂)。

1.2 试剂 蔗糖、柠檬酸、腺苷、新绿原酸、色氨酸、原儿茶醛、原花青素 B2、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、芦丁、东莨菪内酯、阿魏酸、莛草苷、吡啶-3-甲醛、异阿魏酸、野黄芩苷、

木犀草苷、柚皮苷、异槲皮苷、槲皮素、 $\beta$ -细辛醚、熊果酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 111507-202406、111679-202403、110879-202204、112110-202401、140686-202205、110810-202210、112089-202201、110753-202119、112111-202401、110885-201703、110878-201703、100080-202012、110768-202306、110773-202316、111777-202003、420030-202102、111698-201904、110842-202411、111720-202312、110722-202417、111809-202205、100081-202411、112018-201802、110742-202424, 纯度 $\geq$ 96.0%); (-)-没食子儿茶素、紫云英苷对照品 (成都乐美天医药科技有限公司, 批号 DST211101-133、DSTDZ000101, 纯度 $\geq$ 98.0%); 表没食子儿茶素、儿茶精、羽扇豆醇、 $\alpha$ -石竹烯、白绵马素 AA 对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 J1SHB188722、P02A9F57645、D29GB172866、A09IB222406、L01HB173770, 纯度 $\geq$ 93.0%); 3-O-香豆酰基奎宁酸、花椒油素、洋川芎内酯 H、绵马酸 ABA 对照品 (上海诗丹德标准技术服务有限公司, 批号 17533、6787、15809、9593, 纯度 98.0%); 黄绵马酸 AB 对照品 (实验室自制, 纯度 94.7%)。甲醇 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸 (质谱纯, 德国 CNW 公司); 95% 乙醇 (分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 超纯水 (实验室自制)。

1.3 药材 绵马贯众共 6 批, 经广东一方制药有限公司孙冬梅主任中药师鉴定为鳞毛蕨科植物粗茎鳞毛蕨 *Dryopteris crassirhizoma* Nakai 的干燥根茎和叶柄残基, 具体见表 1。

表 1 绵马贯众信息

编号	产地
1	辽宁省铁岭市
2	辽宁省鞍山市
3	黑龙江省佳木斯市
4	吉林省延边朝鲜族自治州敦化市
5	吉林省吉林市
6	黑龙江省佳木斯市

## 2 方法

2.1 对照品溶液制备 精密称取蔗糖、柠檬酸、腺苷、(-)-没食子儿茶素、新绿原酸、色氨酸、原儿茶醛、表没食子儿茶素、儿茶精、原花青素B2、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、3-O-香豆酰基奎宁酸、芦丁、东莨菪内酯、阿魏酸、荜草苷、吡啶-3-甲醛、异阿魏酸、野黄芩苷、木犀草苷、柚皮苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、花椒油素、 $\beta$ -细辛醚、洋川芎内酯H、黄绵马酸AB、羽扇豆醇、 $\alpha$ -石竹烯、白绵马素AA、熊果酸、绵马酸ABA对照品适量，置于5 mL量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，摇匀，即得质量浓度分别为1.269、0.717、0.648、0.956、1.175、0.973、0.988、1.074、1.212、1.349、1.018、0.865、1.257、0.721、0.720、1.416、1.455、0.985、0.861、0.781、1.066、0.922、0.824、0.860、0.654、1.177、1.854、0.943、0.818、1.217、1.591、1.047、0.715、1.261、0.839、1.014 mg/mL的母液，分别取1 mL至50 mL量瓶中，甲醇定容至刻度，摇匀，即得。

### 2.2 供试品溶液制备

2.2.1 95%乙醇冷浸超声提取部位(EG) 取药材粗粉约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入50 mL 95%乙醇，称定质量，超声处理(功率300 W，频率40 kHz)60 min，取出，放冷，95%乙醇补足缺失的质量，摇匀，0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.2 95%乙醇加热回流提取部位(EH) 取药材粗粉约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入50 mL 95%乙醇，称定质量，加热回流提取60 min，取出，放冷，95%乙醇补足缺失的质量，摇匀，0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.2.3 水煎煮提取部位(WD) 取药材粗粉约1.0 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入50 mL纯水，称定质量，加热回流提取60 min，取出，放冷，纯水补足缺失的质量，摇匀，0.22  $\mu$ m微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

### 2.3 UPLC-ESI-MS/MS分析条件

2.3.1 色谱 Agilent ZORBAX RRHD StableBond C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 1.8  $\mu$ m); 流动相甲醇(A)-0.2%甲酸(B)，梯度洗脱(0~20 min, 5%~30%A; 20~40 min, 30%~67%A; 40~80 min, 67%~95%A; 80~90 min, 95%A); 体积流量0.30 mL/min; 柱温25  $^{\circ}$ C; 进样量1  $\mu$ L。

2.3.2 质谱 加热电喷雾离子源(HESI); 正负离子扫描，扫描范围 $m/z$  100~1 500; 喷雾电压3.80 kV; 加热温度350  $^{\circ}$ C; 毛细管温度350  $^{\circ}$ C; 鞘气、辅助气体积流量35、10 arb; S-lens电压50 V; 归一化碰撞能量20 eV。

2.4 数据处理 取“2.1”“2.2”项下对照品、供试品溶液适量，在“2.3”项条件下进样测定，采集总离子流图和多级质谱图，采用Qual Browser 4.1.39.1、Compound Discover 3.3软件对所提取色谱峰的一级、二级MS进行解析，将误差小于 $5\times 10^{-6}$ 、含有二级碎片信息的化合物作为目标成分。对于已知化合物，直接通过对照品保留时间、准分子离子峰、二级碎片离子信息进行鉴定; 对于未知化合物，将色谱峰保留时间、准分子离子峰、特征碎片离子峰与在线高分辨数据库mzCloud、中药成分高分辨质谱本地数据库OTCML等及相关文献进行比对，推导其分子结构和裂解途径并进行鉴定。以峰面积为变量，采用SIMCA 14.1软件对峰面积进行偏最小二乘法判别分析，Hiplot软件绘制聚类热图，分析药材不同部位化学成分变化。

## 3 结果

3.1 化合物鉴定 共鉴定出72个(间苯三酚类22个，黄酮类19个，苯丙素类8个，萜类6个，脂肪族类5个，芳香族类4个，糖苷类4个，甾体类1个，核苷类1个，氨基酸类1个，生物碱类1个)，其中36个与对照品比对后确认，见图1~2、表2。

### 3.2 裂解规律及特征碎片离子

3.2.1 间苯三酚类 以化合物**63**为例，在负离子模式下，该成分准分子离子 $m/z$  403.139 9 [M-H]<sup>-</sup>在绵马酚环与绵马根酸环连接处断裂，形成碎片离子 $m/z$  195.065 7 [M-H-C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>、207.065 7 [M-H-C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>]<sup>-</sup>，脱去一分子C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>和一分子CO，形成碎片离子 $m/z$  165.091 1 [M-H-C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>]<sup>-</sup>、137.059 7 [M-H-C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-CO]<sup>-</sup>。质谱信息与文献[15, 22]一致，故推测化合物**63**为去甲黄绵马酸AB，裂解途径见图3。

3.2.2 黄酮类 以化合物**11**为例，在负离子模式下，该成分准分子离子 $m/z$  289.071 8 [M-H]<sup>-</sup>脱去一分子H<sub>2</sub>O，形成碎片离子 $m/z$  271.061 6 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>，再脱去一分子C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>，形成碎片离子 $m/z$  203.070 7 [M-H-H<sub>2</sub>O-C<sub>3</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>；或脱去一分子CO<sub>2</sub>，形成碎片离子 $m/z$  245.081 7 [M-H-CO<sub>2</sub>]<sup>-</sup>；或在



续表 2

序号	$t_R$ /min	名称	分子式	母离子 $m/z$	碎片离子 $m/z$	离子模式	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	文献
20	23.81	1-丙酰基间苯三酚	$C_9H_{10}O_4$	182.057 9	65.002 0,81.033 2,97.028 2,83.012 5	$[M+H]^+$	-0.32	[14]
21*	25.14	表儿茶素	$C_{15}H_{14}O_6$	290.079 0	139.039 0,123.044 2,147.044 1,207.065 3	$[M-H]^-$	-0.03	—
22	25.36	贯众苷	$C_{17}H_{16}O_6$	316.094 7	78.957 6,123.043 8,83.012 5,97.028 2	$[M-H]^-$	0.94	—
23*	26.25	3-O-香豆酰基奎宁酸	$C_{16}H_{18}O_8$	338.100 2	93.033 2,191.055 4,119.049 0,85.028 1	$[M-H]^-$	0.09	[14]
24	27.11	4 $\beta$ -羧甲基(-)-表儿茶素	$C_{17}H_{16}O_8$	348.084 5	123.044 3,68.997 8,95.049 6,67.055 0	$[M+H]^+$	-0.40	[14]
25	28.78	双花母草素	$C_{16}H_{18}O_9$	354.095 1	233.045 2,234.048 7,205.050 1,353.088 4	$[M-H]^-$	0.86	[15]
26*	28.98	芦丁	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.153 4	447.093 5,448.097 0,609.147 0,610.151 4	$[M-H]^-$	0.80	—
27*	29.68	东莨菪内酯	$C_{10}H_8O_4$	192.042 3	133.028 6,193.049 9,178.026 3,137.059 9	$[M-H]^-$	-0.41	—
28	29.72	二氢槲皮素	$C_{15}H_{12}O_7$	304.058 3	158.044 8,119.048 9,145.028 4,162.055 1	$[M-H]^-$	0.84	—
29*	30.45	阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	194.057 9	145.028 6,117.033 8,149.060 0,177.054 7	$[M-H]^-$	-2.25	—
30*	30.45	荜苳苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100 6	447.093 5,284.032 8,285.039 8,448.097 3	$[M-H]^-$	-0.27	—
31*	30.89	吡啶-3-甲醛	$C_6H_7NO$	145.052 8	118.065 5,91.054 8,117.057 6,119.068 7	$[M+H]^+$	-0.22	—
32*	31.62	异阿魏酸	$C_{10}H_{10}O_4$	194.057 9	145.028 6,117.033 8,149.060 0,177.054 7	$[M-H]^-$	-0.15	—
33*	33.44	野黄芩苷	$C_{21}H_{18}O_{12}$	462.079 8	285.040 3,113.023 0,286.043 7,85.028 0	$[M-H]^-$	0.17	—
34*	33.51	木犀草苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100 6	447.093 5,284.032 8,285.039 8,448.097 3	$[M-H]^-$	0.31	—
35*	33.65	柚皮苷	$C_{27}H_{32}O_{14}$	580.179 2	579.172 6,580.176 4,271.061 2,459.116 1	$[M-H]^-$	0.18	—
36*	34.19	异槲皮苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.095 5	56.695 1,59.266 4,61.971 6,71.818 2	$[M-H]^-$	-0.09	[18]
37	34.75	3-甲基丁酰基间苯三酚-4,6-二-C-葡萄糖苷	$C_{23}H_{34}O_{14}$	534.194 9	413.145 3,251.092 2,414.149 0,275.092 5	$[M-H]^-$	0.69	[14]
38	36.33	山柰酚-3-O-葡萄糖醛酸苷	$C_{21}H_{18}O_{12}$	462.079 8	287.054 9,288.058 3,463.087 0,464.090 3	$[M-H]^-$	0.77	[14]
39*	36.49	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.100 6	447.093 5,284.032 8,285.039 8,448.097 3	$[M-H]^-$	-0.13	—
40	36.74	圣草酚	$C_{15}H_{12}O_6$	288.063 4	153.018 4,135.044 2,67.018 7,117.033 8	$[M-H]^-$	-0.77	—
41*	39.33	槲皮素	$C_{15}H_{10}O_7$	302.042 7	151.002 5,178.997 6,301.035 4,121.028 2	$[M-H]^-$	-0.87	—
42	43.27	$\alpha$ -姜黄烯	$C_{15}H_{22}$	202.172 2	95.086 1,147.117 0,109.101 6,107.086 0	$[M+H]^+$	0.45	[19]
43*	44.10	花椒油素	$C_{10}H_{12}O_4$	196.073 6	151.075 3,81.033 2,111.043 8,109.064 6	$[M-H]^-$	-0.24	—
44	44.12	绵马酚 B	$C_{12}H_{16}O_4$	224.104 9	79.017 6,55.017 6,51.022 8,97.028 5	$[M-H]^-$	-1.19	[19]
45*	45.25	$\beta$ -细辛醚	$C_{12}H_{16}O_3$	208.109 9	179.070 3,194.094 0,181.086 0,151.075 6	$[M+H]^+$	-0.55	—
46*	47.58	洋川芎内酯 H	$C_{12}H_{16}O_4$	224.104 9	179.106 8,223.097 1,167.070 4,109.064 5	$[M-H]^-$	-1.71	—
47	47.98	高藜芦酸	$C_{10}H_{12}O_4$	196.073 6	151.075 4,195.065 6,81.033 2,152.078 8	$[M-H]^-$	-3.53	—
48	50.53	16 $\beta$ ,17-二羟贝壳杉烷-18-羧酸	$C_{26}H_{32}O_4$	336.230 1	336.252 3,337.237 9,335.218 8,194.115 8	$[M-H]^-$	-1.15	[20]
49	51.23	1-乙酰基-3-丁酰基间苯三酚	$C_{12}H_{14}O_5$	238.084 1	79.017 6,83.012 5,55.017 7,107.012 4	$[M-H]^-$	-0.76	[15]
50	52.62	1-丁酰基间苯三酚	$C_{10}H_{12}O_4$	196.073 6	151.075 3,81.033 2,111.043 8,109.064 6	$[M+H]^+$	-2.20	[15]
51	52.86	牛膝甾酮 A	$C_{27}H_{44}O_7$	480.308 7	152.046 9,151.039 1,123.043 9,153.051 2	$[M-H]^-$	0.62	[20]
52*	53.03	黄绵马酸 AB	$C_{22}H_{26}O_8$	418.162 8	151.075 4,165.091 2,83.012 5,95.048 9	$[M-H]^-$	0.57	[20-21]
53	54.35	1-甲基-3-丁酰基间苯三酚	$C_{11}H_{14}O_4$	210.089 2	55.017 7,79.017 7,65.002 1,175.609 4	$[M-H]^-$	-2.04	[15]
54	54.74	白绵马素 AP	$C_{22}H_{26}O_8$	418.162 8	151.075 4,165.091 2,83.012 5,95.048 9	$[M-H]^-$	0.52	[20-21]
55	56.13	花柏烯	$C_{15}H_{24}$	204.187 8	107.085 9,95.086 0,93.070 4,149.132 5	$[M+H]^+$	0.44	[16]
56	57.28	白绵马素 PP	$C_{23}H_{28}O_8$	432.178 4	165.091 1,97.028 1,95.048 9,109.064 6	$[M-H]^-$	0.57	[20-21]
57	58.90	1-异戊酰基间苯三酚	$C_{11}H_{14}O_4$	210.089 2	55.017 7,79.017 7,65.002 1,175.609 4	$[M-H]^-$	-2.39	[22]
58	59.31	黄绵马酸 PB	$C_{23}H_{28}O_8$	432.178 4	111.043 8,165.091 1,179.106 9,109.064 5	$[M-H]^-$	-0.06	[6,23]
59*	62.05	羽扇豆醇	$C_{30}H_{50}O$	426.386 2	427.393 7,109.101 6,95.086 0,81.070 5	$[M+H]^+$	-0.34	—
60*	62.35	$\alpha$ -石竹烯	$C_{15}H_{24}$	204.187 8	55.055 1,79.054 9,91.054 8,81.070 6	$[M+H]^+$	-0.18	[19]
61*	66.12	白绵马素 AA	$C_{21}H_{24}O_8$	404.147 1	195.065 7,151.075 5,207.065 7,196.069 1	$[M-H]^-$	-0.32	[20-21]
62	66.56	aemulinBB	$C_{24}H_{30}O_8$	446.194 1	111.043 8,165.091 1,179.106 9,109.064 5	$[M-H]^-$	0.21	[19]
63	67.61	去甲黄绵马酸 AB	$C_{21}H_{24}O_8$	404.147 1	195.065 7,165.091 1,207.065 7,137.059 7	$[M-H]^-$	0.11	[15,22]
64	67.92	亚甲基双甲基间苯丁酮	$C_{23}H_{28}O_8$	432.178 4	165.091 1,97.028 1,95.048 9,109.064 6	$[M-H]^-$	-0.14	[5]
65	69.53	5-乙氧基-10-姜酚	$C_{23}H_{38}O_4$	378.277 0	401.266 2,402.269 6,400.312 8,90.965 6	$[M+Na]^+$	0.03	—
66	70.91	绵马素 AB	$C_{23}H_{28}O_8$	432.178 4	165.091 1,97.028 1,95.048 9,109.064 6	$[M-H]^-$	-0.09	[21]
67*	72.34	熊果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	456.360 4	479.349 3,480.352 7,497.362 7,73.283 5	$[M+Na]^+$	0.28	[15]
68	74.47	绵马素 ABP	$C_{33}H_{38}O_{12}$	626.236 3	207.065 8,221.081 6,195.065 6,209.081 5	$[M-H]^-$	0.62	[20-21]
69	74.65	绵马素 ABB	$C_{34}H_{40}O_{12}$	640.252 0	207.065 7,221.081 6,209.081 5,195.065 6	$[M-H]^-$	0.81	[19-20]
70	75.83	二去甲基伪绵马素 AA	$C_{19}H_{20}O_8$	376.115 8	123.043 9,81.033 1,83.012 5,151.075 3	$[M-H]^-$	-0.13	[18]
71*	76.27	绵马素 ABA	$C_{32}H_{36}O_{12}$	612.220 7	207.065 9,195.065 7,151.075 4,137.023 4	$[M-H]^-$	0.25	[19-20]
72	77.16	绵马素 PBP	$C_{34}H_{40}O_{12}$	640.252 0	207.065 7,221.081 6,209.081 5,195.065 6	$[M-H]^-$	0.24	[21]

注：\*表示经对照品确认的成分。

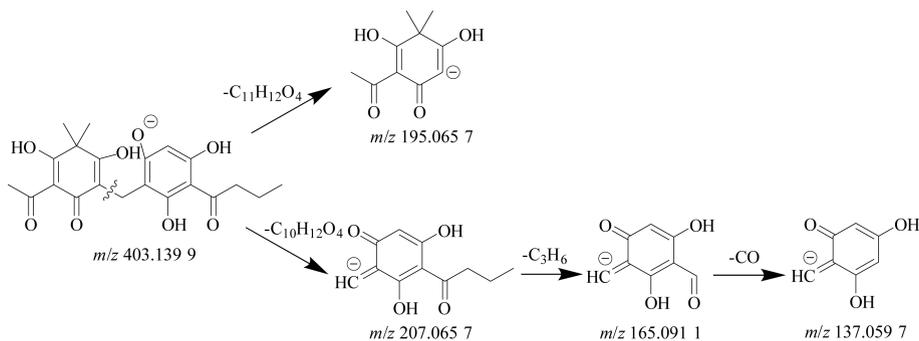


图3 去甲黄绵马酸 AB 裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathway of norflavaspidic acid AB

诱导碰撞解离条件下发生 C 环特征裂解逆迪尔斯-阿尔德反应, 在 2 位 C-O 键和 C3-C4 键断裂, 产生包含 A 环的碎片离子  $m/z$  137.023 3。质谱信息

与文献 [24] 一致, 推测化合物 **11** 为儿茶精, 裂解途径见图 4。

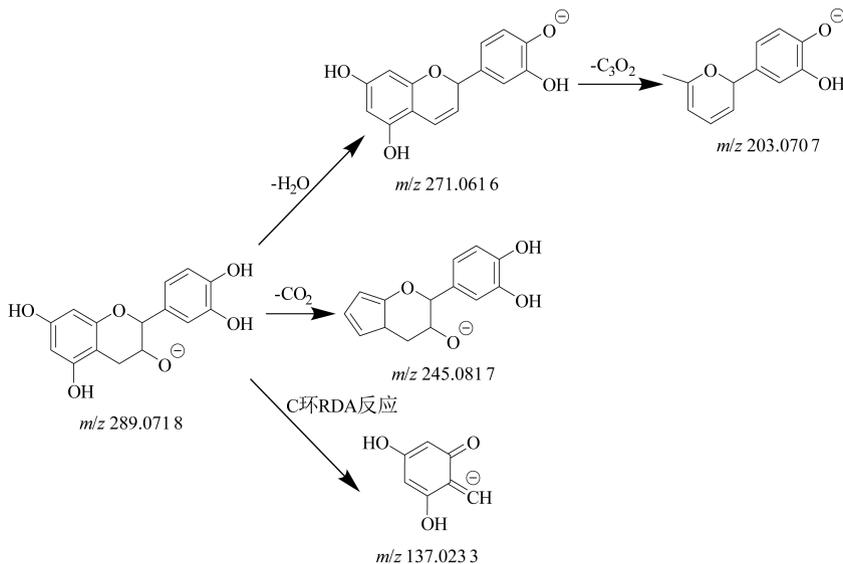


图4 儿茶精裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of cyanidanol

3.2.3 苯丙素类 以化合物 **16** 为例, 在负离子模式下, 该成分准分子离子  $m/z$  353.087 9  $[M-H]^-$  的 4 位 C-O 键断裂, 形成碎片离子  $m/z$  179.034 1  $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$ 、173.044 6  $[M-H-C_9H_8O_4]^-$ , 脱去一分子  $CO_2$ , 形成碎片离子  $m/z$  135.043 9  $[M-H-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$ ; 或酯键断裂, 生成碎片离子  $m/z$  191.055 4  $[M-H-C_9H_8O_3]^-$ 。质谱信息与文献 [14] 一致, 推测化合物 **16** 为隐绿原酸, 裂解途径见图 5。

3.2.4 糖苷类 C-糖苷类化合物在 MS 裂解过程中首先在糖元内部进行裂解, O-糖苷类化合物则通常在糖苷键位置发生裂解<sup>[25]</sup>。以化合物 **17** 为例, 在正离子模式下, 该成分准分子离子  $m/z$  355.102 2  $[M+H]^+$ , 糖元内 1 位 C-O 键和 C1-C2

键断裂, 形成碎片离子  $m/z$  205.049 7  $[M+H-C_5H_{10}O_5]^+$ ; 或糖元内 1 位 C-O 键和 C2-C3 键断裂, 形成碎片离子  $m/z$  235.060 1  $[M+H-C_4H_8O_4]^+$ ; 或脱去一分子  $H_2O$ , 形成碎片离子  $m/z$  337.091 6  $[M-H-H_2O]^+$ ; 或 8 位糖苷键断裂, 形成碎片离子  $m/z$  193.049 7  $[M-H-C_6H_{10}O_5]^+$ 。质谱信息与文献 [15] 一致, 推测化合物 **17** 为异双花母草素, 裂解途径见图 6。

### 3.3 化学计量学研究

3.3.1 热图聚类分析 采用 Hiplot 软件对各成分峰面积进行分析, 结果见图 7。由此可知, EC、EH、WD 各聚为 3 类, 各成分聚为 7 类, 一类为 95% 乙醇、水煎煮提取部位的差异性成分, 主要包括黄酮类 (槲皮素、紫云英苷、异槲皮苷等) 和

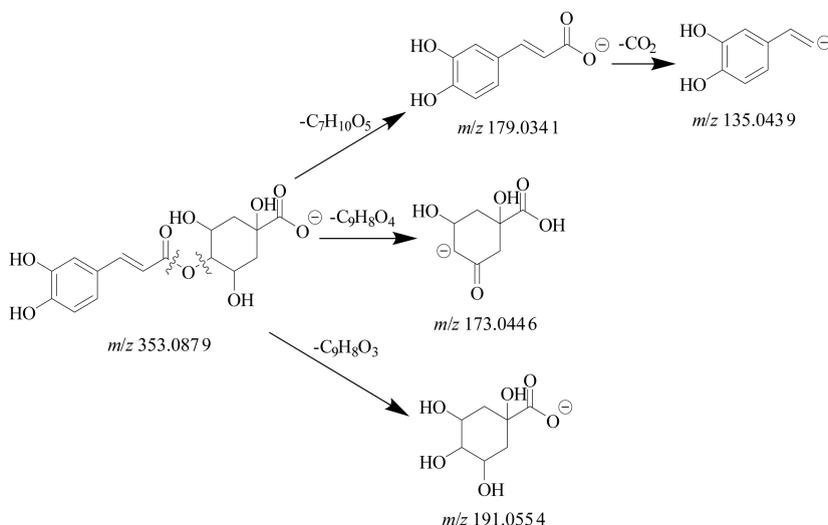


图5 隐绿原酸裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathway of (-)-cryptochlorogenic acid

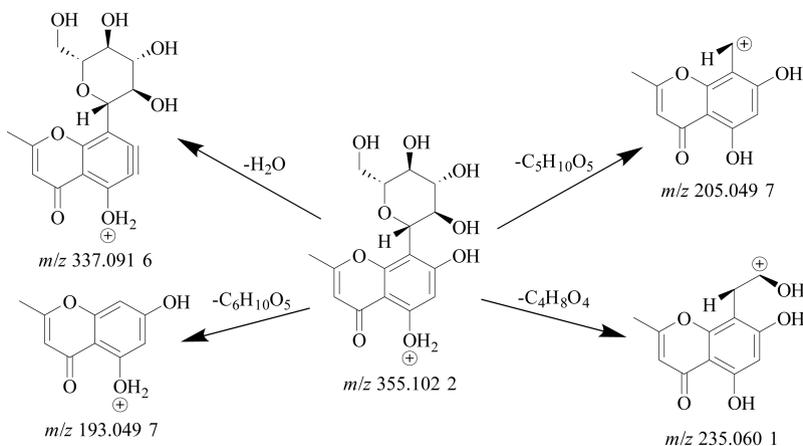


图6 异双花母草素裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathway of isobiflorin

间苯三酚类（如1-丁酰基间苯三酚、绵马素AB、绵马酸ABP等），共34种，在WD中含量较低，在EC、EH中含量相近；一类为EH中含量明显高于EC、WD的5种成分，包括东茛菪内酯、儿茶精、表儿茶素、表没食子儿茶素、吡啶-3-甲醛；一类为EC中含量明显高于EH、WD中的4种成分，包括绵马酸PBP、二去甲基伪绵马素AA、黄绵马酸AB、白绵马素PP；一类为EC中含量明显低于EH、WD的9种成分，包括色氨酸、原儿茶醛、双花母草素、(-)-没食子儿茶素等；一类为WD中含量明显高于EC、EH的7种成分，包括腺苷、曲酸、鳞毛蕨苷等；一类为3个不同部位中含量无明显差异的10种成分，包括绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸等；一类为EH中含量明显低于EC、WD的3种成分，包括咖啡酸、蔗糖、花椒油素。

综上所述，EC中间苯三酚类成分含量明显高于EH、WD中，可能与其毒性差异有关。

3.3.2 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA) 采用SIMCA 14.1软件对各成分峰面积进行分析，筛选差异贡献较大者。由图8可知，模型拟合参数 $R^2X(\text{cum}) = 0.806$ ， $R^2Y(\text{cum}) = 0.992$ ，预测能力参数 $Q^2(\text{cum}) = 0.98 > 0.5$ ，表示模型稳定，预测能力较好；18批样品分为3类，EC、EH、WD各为一类，说明不同部位的化学成分差异明显。由图9可知，表儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶精、吡啶-3-甲醛、黄绵马酸AB、二去甲基伪绵马素AA、绵马酸PBP、花椒油素、白绵马素PP、原儿茶醛、(-)-没食子儿茶素等成分远离原点，可能是引起不同部位化学成分差异的物质基础。由图10可知，以VIP值 $>1$ 为标准，筛选出17种差

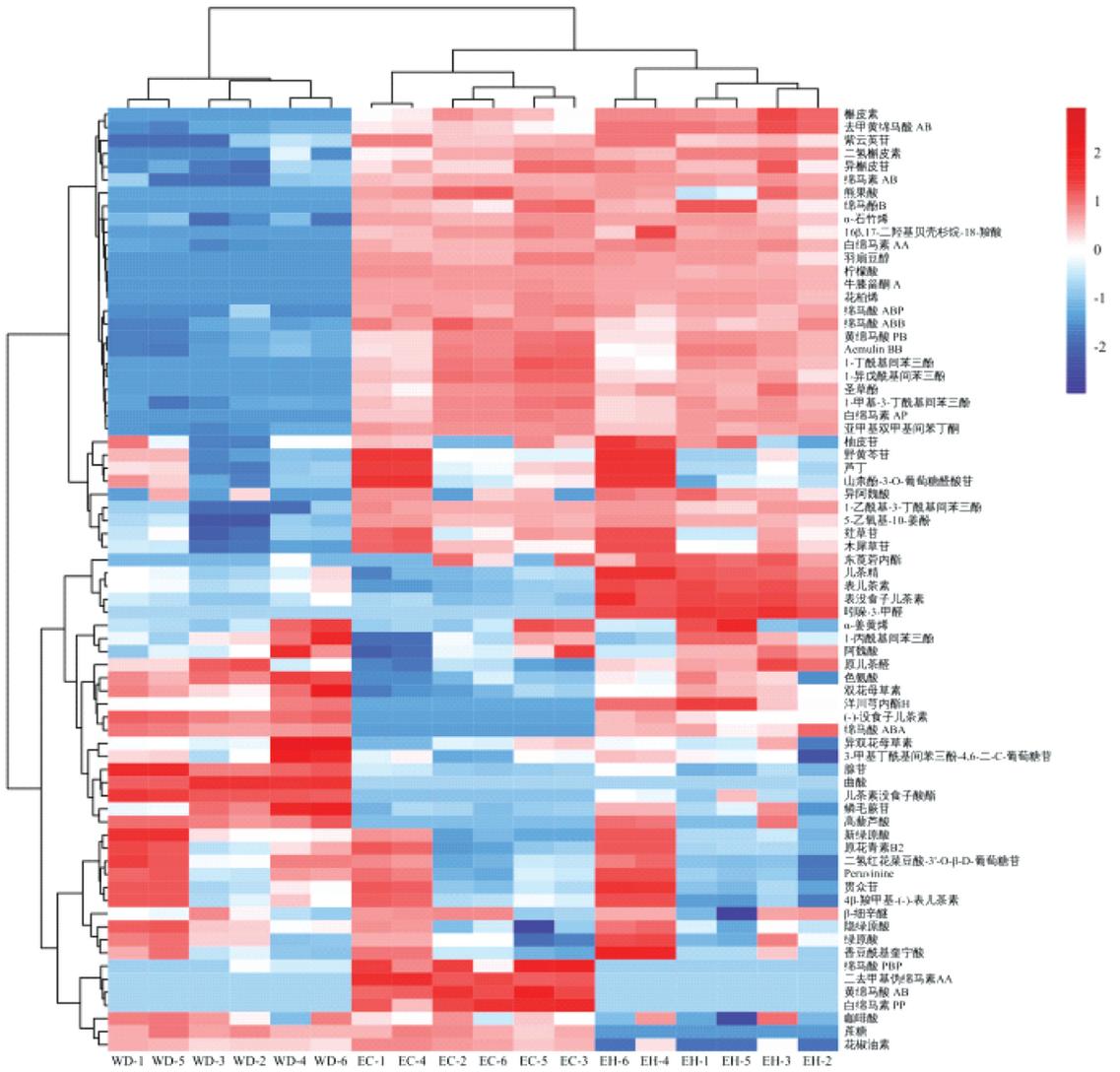


图 7 各成分峰面积热图聚类分析图

Fig. 7 Heatmap cluster analysis plot for peak areas of various constituents

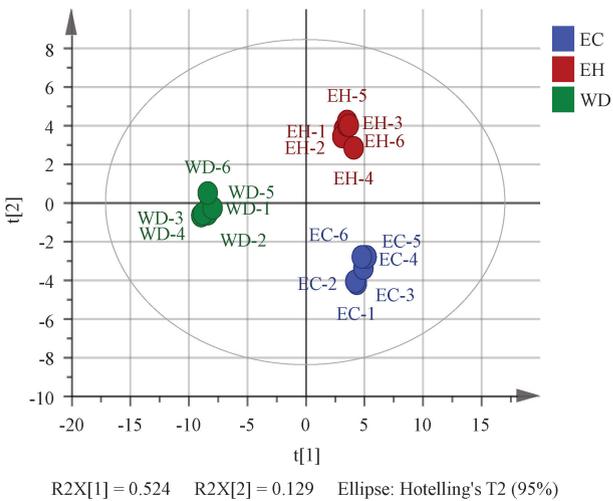


图 8 PLS-DA 得分图

Fig. 8 Score plot for PLS-DA

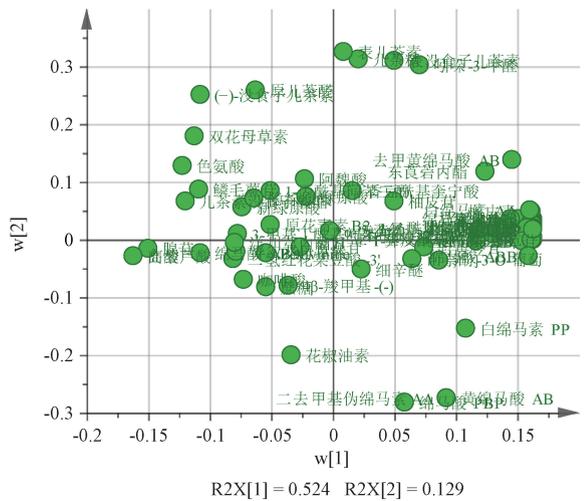


图 9 PLS-DA 载荷图

Fig. 9 Loading plot for PLS-DA

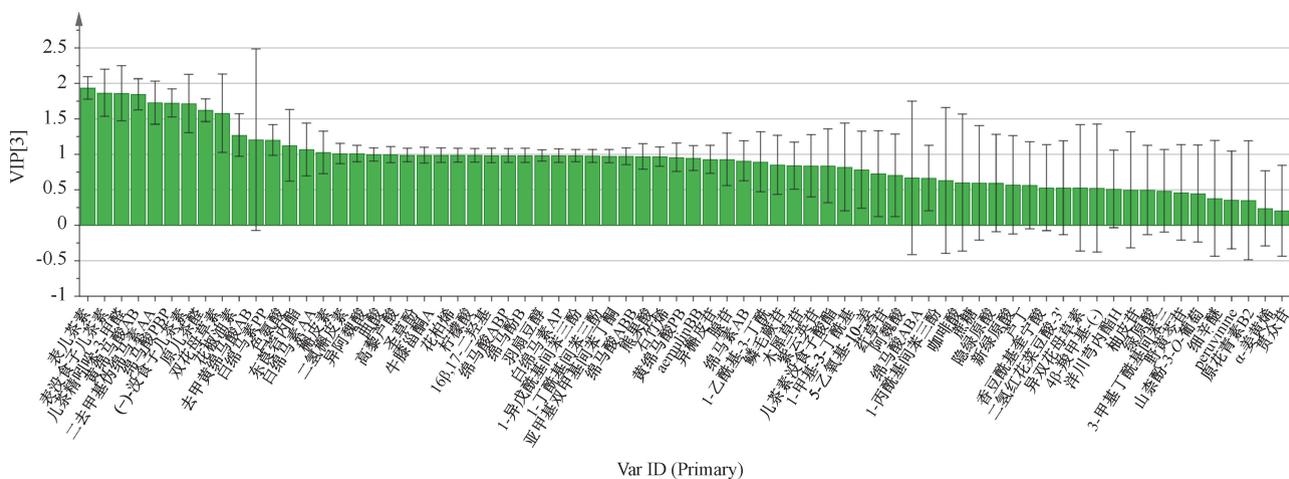


图 10 各成分 VIP 值

Fig. 10 VIP values of various constituents

异性成分，包括黄绵马酸 AB、二去甲基伪绵马素 AA、绵马酸 PBP、去甲黄绵马酸 AB、白绵马素 PP、白绵马素 AA 等 6 个间苯三酚类化合物，表儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶精、(-)-没食子儿茶素、槲皮素等 5 个黄酮类化合物，以及吡啶-3-甲醛、原儿茶醛、双花母草素、花椒油素、色氨酸、东莨菪内酯等其他类成分，与热图聚类分析一致。

#### 4 讨论

绵马贯众在多数本草中被记载为“有毒”或“小毒”，2020 年版《中国药典》也记载其有小毒，但尚未报道该药材毒性成分及其作用机制。本实验对绵马贯众毒性差异较大的 3 个提取部位中化学成分进行分析，发现 EC 中间苯三酚类成分含量明显高于 EH、WD 中，可能是该药材 95% 乙醇冷浸提取部位产生毒性的主要物质基础。

研究表明，黄绵马酸 AB、去甲黄绵马酸 AB、白绵马素 AA 等间苯三酚类成分具有抗病毒、抗菌、抗肿瘤活性<sup>[25-27]</sup>，通常通过干扰病原体或癌细胞的 DNA 复制、蛋白质合成、细胞分裂等生物学过程发挥作用，但也可能对正常细胞产生毒性。间苯三酚类成分的结构中含有多个酚羟基，极性较小，水中溶解度较低，化学性质不稳定，易受光照、温度影响生成醌类化合物，导致其药效改变<sup>[15]</sup>。本实验发现，EH、WD 的 LD<sub>50</sub> 值大于 EC 的，可能与间苯三酚类化合物含量降低有关。

有学者认为，间苯三酚类成分是绵马贯众毒性物质基础<sup>[11]</sup>，并通过毒理实验研究证明绵马酸类成分具有毒性<sup>[12]</sup>。本实验通过 UPLC-ESI-MS/MS

法分析绵马贯众化学成分，发现间苯三酚类为其主要化合物，含量最高，而且 EC 中其含量高于 EH、WD 中，推测它为该药材主要毒性物质基础。另外，绵马贯众自古以来大多以汤剂形式服用，而目前临床常用的为单味饮片提取浓缩制成的中药配方颗粒<sup>[28]</sup>，均采用水煎煮提取，降低了间苯三酚类成分含量，保证了其临床用药安全。

综上所述，本实验采用 UPLC-ESI-MS/MS 法鉴定出绵马贯众中 72 种成分，主要为间苯三酚类、黄酮类、苯丙素类、萜类、糖苷类和其他类，并对间苯三酚类、黄酮类、苯丙素类、糖苷类质谱裂解规律进行分析，结合相关文献发现新增加 32 个化合物，进一步丰富了该药材物质基础，可为其临床应用及毒性物质基础、作用机制研究提供科学依据。另外，间苯三酚类是绵马贯众主要活性物质，具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、杀虫等多种药理作用，在其对病原体达到毒性药效剂量的同时是否会对人体健康造成损害，以及其毒性作用机制、体内代谢途径均不明确，有待进一步探究。后续课题组将通过网络药理学预测绵马贯众中间苯三酚类化合物产生毒性的作用靶点和信号通路，结合分子对接技术筛选出具体相关成分，并进行毒理实验验证，以期全面阐释该药材产生毒性的物质基础及作用机制。

#### 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 522.  
[2] 郭文勇, 廖翠平, 代金刚, 等. 绵马贯众的研究进展及质量标志物预测[J]. 中国现代中药, 2023, 25(8): 1815-1827.

- [ 3 ] 祁 燕, 贾小舟, 郑银丽, 等. 绵马贯众中间苯三酚类化合物分离及其抑菌活性研究[J]. 中草药, 2017, 48(23): 4860-4864.
- [ 4 ] 闫艳韬, 刘 畅, 王 娟, 等. 绵马贯众中流感病毒 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 神经氨酸酶抑制剂的筛选[J]. 中药材, 2018, 41(3): 691-698.
- [ 5 ] Viet N P, Thi V O, Young S Y, *et al.* PTP1B inhibition studies of biological active phloroglucinols from the rhizomes of *Dryopteris crassirhizoma*: Kinetic properties and molecular docking simulation[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 188(10): 719-728.
- [ 6 ] 杨美兰, 李 静. 中药贯众的药理作用研究现状[J]. 当代畜牧, 2021, 14(11): 53-56.
- [ 7 ] 田晓玲, 华 川, 张 艳, 等. 莲花清瘟胶囊防治新型冠状病毒肺炎研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(8): 184-187.
- [ 8 ] 李佳颖, 高 誉, 刘 红, 等. 绵马贯众多糖超声提取工艺优化及抗氧化活性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 79-87.
- [ 9 ] 赵晋彤, 贾莹莹, 李苏苏, 等. 绵马贯众总多酚超声提取工艺的优化及其抗氧化活性[J]. 中成药, 2018, 40(3): 729-732.
- [ 10 ] 罗喜东, 陈鹏飞. 四种中药对鲫鱼的急性毒性试验[J]. 四川畜牧兽医, 2015, 42(10): 22-23; 26.
- [ 11 ] 赵晓悦, 梁 宇, 孔德文, 等. 贯众毒的历史认识与现代研究[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 156-159.
- [ 12 ] 贾旭晨, 许妍妍, 李遇伯. 复方青黛制剂及单味药的毒性研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(24): 8282-8289.
- [ 13 ] 陈东洋, 张 昊, 张 磊, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定发酵食品中的曲酸[J]. 色谱, 2023, 41(7): 632-639.
- [ 14 ] 姚 娜, 黄燕明, 李雪银, 等. 绵马贯众配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(11): 1339-1344.
- [ 15 ] 贾小舟. 绵马贯众总间苯三酚类化合物的富集、分离及其抑菌作用研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [ 16 ] 刘金金, 刘艳梅, 梁 慧, 等. 三化汤化学成分鉴定[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1195-1208.
- [ 17 ] 黄玉阳, 邓瑞雪, 高嘉屿, 等. 绵马贯众中新闻苯三酚类化合物[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(4): 269-271.
- [ 18 ] 董双涛, 徐丽霞, 高建平, 等. 基于一测多评结合熵权逼近理想解排序法对绵马贯众炭的质量评价[J]. 中草药, 2024, 55(7): 2397-2404.
- [ 19 ] 邓国彤. 绵马贯众化学成分研究[D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [ 20 ] 王 娟. 绵马贯众中间苯三酚类化合物抗 H5N1 流感病毒活性筛选及代谢研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [ 21 ] 袁丽鹏. 绵马贯众间苯三酚类成分提取分离及抑菌活性研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
- [ 22 ] Ren Q, Quan X G, Wang Y L, *et al.* Isolation and identification of phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* by HPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry[J]. *Chem Nat Compd*, 2016, 52(6): 1137-1140.
- [ 23 ] Van C P, Okhwa K, Jeong-hyung L, *et al.* Inhibitory effects of phloroglucinols from the roots of *Dryopteris crassirhizoma* on melanogenesis[J]. *Phytochem Lett*, 2017, 21(2): 51-56.
- [ 24 ] Hiroshi T, Ryo N, Tetsuya M, *et al.* A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(4): 295-298.
- [ 25 ] 王英力, 杨欣欣, 李天娇, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法快速鉴定加味八珍益母膏化学成分[J]. 中南药学, 2024, 22(2): 358-367.
- [ 26 ] 贾莹莹, 赵晋彤, 韩香玉, 等. 中药绵马贯众化学成分及药理作用研究概述[J]. 亚太传统医药, 2017, 13(19): 53-56.
- [ 27 ] Yuk H J, Kim J Y, Sung Y Y, *et al.* Phloroglucinol derivatives from *Dryopteris crassirhizoma* as potent xanthine oxidase inhibitors[J]. *Molecules*, 2020, 26(1): 122-122.
- [ 28 ] 谭清立, 李佳怡, 林岱衡. 我国中药配方颗粒的政策工具分析及优化研究[J]. 中国药房, 2023, 34(22): 2689-2694.