2026 年 8 月 色 谱 Vol.44 No.8
August 2026 Chinese Journal of Chromatography 924~934

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.12018

肝微粒体代谢产物导向的前胡角型吡喃香豆素分离及代谢产物结构鉴定

杨 阳[1], 刘明昊[1], 金 慧[1], 孙润泽[1], 龚兴成[1*], 刘文静[2*], 宋月林[1]

(1. 北京中医药大学, 北京 102401; 2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

摘要:鉴定活性成分代谢产物的结构对于阐明中药体内药效物质至关重要。然而,代谢产物对照品难以获得,仅凭借常规手段难以实现代谢产物结构的准确鉴定。本研究建立了以活性成分肝微粒体代谢产物的保留时间和质谱信息为导向的分离策略,即通过液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)追踪,从原药材中定向分离并鉴定目标化合物,将其作为对照品实现肝微粒体代谢产物结构的准确鉴定,进而解析代谢路径。前期研究表明前胡的主要活性成分角型吡喃香豆素(APs)在体内易发生水解反应,本研究选取一对 APs 同分异构体化合物(+)-白花前胡甲素((+)-PA)与(+)-北美芹素((+)-Pte)为底物,分别与人肝微粒体(HLMs)进行体外孵育,利用 LC-MS 分别检测到 8 个(包括 3 个水解产物和 5 个氧化产物)和 9 个(包括 5 个水解产物和 4 个氧化产物)代谢产物。基于上述策略,从前胡提取物中定向分离制备得到 9 个 APs,包含 4 对对映体,分别为(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆素 C(1a/b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆素 B(2a/b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-3′-当归酰氧基-4′-羟基-3′,4′-二氢邪蒿内酯(3a/b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-3′-羟基-4′-当归酰氧基-3′,4′-二氢邪蒿内酯(4a/b)和(3′*S*,4′*S*)-isoepoxypteryxin(5)。其中,化合物 1b、2b 为已知平面结构的新构型。通过与各化学单体进行比对,成功实现了(+)-PA(4 个)和(+)-Pte(5 个)主要代谢产物的准确鉴定,更揭示了水解、氧化反应及酰基迁移为 APs 的主要代谢途径。综上,该策略不仅实现了前胡 APs 的高效分离及(+)-PA 和(+)-Pte 系列代谢产物结构的准确鉴定,更阐明了 APs 的主要代谢途径,为中药代谢产物结构的准确鉴定和对照品的获取提供了有效方法。

关键词:液相色谱-质谱联用技术;导向分离;角型吡喃香豆素;代谢产物;结构鉴定

中图分类号:O658 **文献标识码**:A

Isolation of angular-type pyranocoumarins from *Peucedani Radix* guided by liver microsomal metabolites and structural identification of the metabolites

YANG Yang[1], LIU Minghao[1], JIN Hui[1], SUN Runze[1], GONG Xingcheng[1*], LIU Wenjing[2*], SONG Yuelin[1]

(*1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China;*
2. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Identifying the structures of metabolites is of great importance towards elucidating the therapeutic material basis of traditional Chinese medicines (TCMs). However, current studies lack sufficient reference standards, hindering the structural identification of metabolites. This study establishes a strategy guided by the retention times and mass spectrometric information of microsomal metabolites. By coupling liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) to trace and isolate target compounds from the raw materials, these compounds served as reference standards to confirm the structures of microsomal metabolites, thereby elucidating the metabolic pathways. *Peucedani Radix* (PR, Chinese name: Qianhu) consists of the dried roots of *Peucedanum pra-*

收稿日期:2025-12-27

* **通信联系人**.E-mail:kkgxc1996@163.com(龚兴成);E-mail:liuwj107@163.com(刘文静).

基金项目:河南省自然科学基金(252300421619).

Foundation item: Henan Natural Science Foundation (No. 252300421619).

eruptorum Dunn and contains abundant angular-type pyranocoumarins (APs), which serve as primary chemical constituents and effective compound clusters as well. From the structural standpoint, C-3′ and C-4′ sites of APs are frequently substituted by acetoxyl, angeloxyl, isovaleroxyl and some other moieties, leading to the extensive occurrences of *regio*-isomers, which not only possess comparable structures but also similar chemical properties. Previous studies have preliminarily unveiled that APs primarily undergo hydrolysis and acyl migration *in vivo*, and these hydrolytic metabolites can be observed in both *in vitro* metabolism and the raw materials. In this study, a pair of *regio*-isomers from PR, *i.e.*, (+)-(3′*S*,4′*S*)-praeruptorin A ((+)-PA) and (+)-(3′*R*,4′*R*)-pteryxin ((+)-Pte), was incubated separately with human liver microsomes (HLMs) in the presence of necessary cofactors to simulate the metabolic pathways occurring *in vivo*. After carefully processing LC-MS datasets and applying the well-defined mass fragmentation rules of APs, eight metabolites were detected and putatively identified for (+)-PA, including three hydrolysis products together with five oxidation products, whereas nine metabolites were observed and putatively identified for (+)-Pte, encompassing five hydrolysis products and four oxidation products. Noteworthily, phase I metabolism of (+)-Pte in HLMs was profiled for the first time. Various column chromatographic tools, such as silica gel column chromatography, C_{18} reversed-phase chromatography (ODS), Sephadex LH-20 and semi-preparative high performance liquid chromatography equipped with achiral or chiral columns, were employed to isolate compounds-of-interest from PR extracts under the guidance of LC-MS through taking both retention time and MS/MS information into account. A total of nine AP compounds were successfully purified from PR extracts, and notably, four pairs of AP enantiomers were involved. By matching ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectral information with the data archived in the literature, these compounds were identified as (3′*S*,4′*S*)-qianhucoumarin C (1a), (3′*R*,4′*R*)-qianhucoumarin C (1b), (3′*S*,4′*S*)-qianhucoumarin B (2a), (3′*R*,4′*R*)-qianhucoumarin B (2b), (3′*S*,4′*S*)-3′-angeloylkhellactone (3a), (3′*R*,4′*R*)-3′-angeloylkhellactone (3b), (3′*S*,4′*S*)-4′-angeloylkhellactone (4a), (3′*R*,4′*R*)-4′-angeloylkhellactone (4b) and (3′*S*,4′*S*)-isoepoxypteryxin (5). Thereof, compounds 1b and 2b represent new configurational structures of known planar structures. The study summarized mass fragmentation rules for APs and achieved accurate identification of two pairs of *regio*-isomers: qianhucoumarin B and C, and 3′- and 4′-angeloylkhellactone. Thereafter, *in vitro* metabolites of (+)-PA and (+)-Pte were successfully identified by comparing the retention times and MS/MS information with authentic compounds, including *cis*-khellactone, qianhucoumarin B, qianhucoumarin C, 3′-angeloylkhellactone, 4′-angeloylkhellactone and (3′*S*,4′*S*)-isoepoxypteryxin. Regarding the three hydrolytic metabolites, *i.e.*, *cis*-khellactone, qianhucoumarin B and qianhucoumarin C, they were shared by (+)-PA and (+)-Pte. Hydrolysis and oxidation reactions, as well as acyl migration, served as the primary metabolic pathways for APs in HLMs. In this study, (+)-PA and (+)-Pte were selected as representatives to demonstrate that it is feasible to obtain their metabolites from PR extracts through LC-MS-guided isolation and purification. After structural identification through analyzing ^{1}H- and ^{13}C-NMR spectral information, these pure compounds were eligible authentic compounds enabling

引用本文:杨阳,刘明昊,金慧,孙润泽,龚兴成,刘文静,宋月林. 肝微粒体代谢产物导向的前胡角型吡喃香豆素分离及代谢产物结构鉴定. 色谱,2026,44(8):924-934.

YANG Yang, LIU Minghao, JIN Hui, SUN Runze, GONG Xingcheng, LIU Wenjing, SONG Yuelin. Isolation of angular-type pyranocoumarins from *Peucedani Radix* guided by liver microsomal metabolites and structural identification of the metabolites. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(8): 924-934.

confirmative structural identification of metabolites, providing pronounced insights into the primary metabolic pathways of APs and offering an effective approach for the accurate identification of metabolite structures through isolating authentic compounds that are available in the original TCM. However, due to differences in metabolism between *in vitro* and *in vivo*, the study failed to construct a definitive structure-activity relationship for the metabolites. Future studies should be devoted to validating these findings through performing *in vivo* investigations.

Keywords: liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); guided separation; angular-type pyranocoumarins; metabolites; structural identification

中药活性成分及其代谢产物是发挥药效的重要组成。研究表明活性成分(如左旋延胡索乙素、松果菊苷、淫羊藿素等)进入体内后,其代谢产物常保留或呈现出更好的生物活性。中药口服给药后,在体内常产生大量的代谢产物,准确鉴定代谢产物结构对于深入阐明中药的药效物质基础至关重要。由于缺乏相关对照品,代谢产物的准确鉴定十分困难。而这些代谢产物可能作为药材原型成分存在于植物中。例如,肉苁蓉主要活性成分松果菊苷在体内可代谢为毛蕊花糖苷,而后者亦为其天然成分之一[1-3]。因此,本研究建立了以活性成分肝微粒体代谢产物保留时间和质谱信息为导向的分离策略,通过液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)追踪原药材中目标成分,并从原药材中定向分离和鉴定目标化合物,将其作为对照品实现肝微粒体代谢产物的结构鉴定。

前胡(*Peucedani Radix*)为伞形科植物白花前胡(*Peucedanum praeruptorum* Dunn)的干燥根,具有降气化痰、疏散风热等功效,临床多用于痰热咳喘、风热感冒等症[4]。角型吡喃香豆素(angular-type pyranocoumarins,APs)作为前胡主要的药效成分,具有祛痰、止咳等活性[5,6]。该类化合物常以顺式凯琳内酯(*cis*-khellactone)为母核,吡喃环的C-3′和(或)C-4′常连接乙酰氧基、当归酰氧基等基团,且因手性中心的存在,导致原药材中广泛存在位置异构体和对映异构体,化学组成复杂。课题组前期研究结果表明,前胡主要活性成分白花前胡甲素对映体((±)-praeruptorin A, (±)-PA)、右旋白花前胡乙素((+)-praeruptorin B, (+)-PB)等在体内代谢途径主要为酯键水解、氧化反应及酰基迁移[7,8]。然而,受限于代谢产物含量极低且缺乏对照品,加之 APs 成分结构的高度相似性,仅依赖 LC-MS 技术难以准确区分复杂的同分异构体,导致多数微量代谢产物的结构难以鉴定。结合课题组前期对前胡提取物的定性分析结果[9,10]以及文献中已报道的前胡化学成分[11-13],我们推测 APs 的体内代谢产物同样也作为原型成分存在于前胡原药材中。因此,开发高效的代谢产物对照品获取方法,可以实现 APs 活性代谢产物的准确鉴定,为前胡药效物质的深入阐明奠定基础。

体外代谢模型,如人肝微粒体(human liver microsomes,HLMs)孵育系统,可以产生多种体内代谢产物,较好地模拟体内代谢过程。因此,为了实现代谢产物的准确鉴定,本研究建立以肝微粒体代谢产物为导向的分离策略:(1)通过 HLMs 孵育体系获得(+)-PA 和(+)-北美芹素((+)-pteryxin,(+)-Pte)的主要代谢产物,基于 LC-MS 技术解析其保留时间、特征碎片离子等信息;(2)将这些信息作为导向,在前胡提取物中进行成分匹配;(3)综合运用多种色谱分离技术(如硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、反相色谱和手性色谱等)从前胡提取物中定向制备目标 APs 成分,将其作为对照品实现(+)-PA 和(+)-Pte 的部分代谢产物的结构鉴定。本研究通过此策略,实现了前胡中 APs 化合物的高效分离与结构鉴定,进而阐明了(+)-PA 和(+)-Pte 的代谢路径,为中药药效成分的体内代谢和起效形式研究提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo-Fisher U3000 双三元分析型液相色谱仪(美国 Thermo-Fisher 公司);SCIEX Triple TOF 6600$^+$(美国 SCIEX 公司);LC-20AD$_{XR}$ 型分析型液相色谱仪和 LC-20AT 型半制备型液相色谱仪(日本岛津公司);硅胶(200~300 目)和 GF$_{254}$ 硅胶预制板(青岛海洋化工厂);ODS 填料(40~63 μm,德国 Merck 公司)。

提取分离所用无水乙醇(EtOH)、石油醚(PE)、

二氯甲烷(DCM)、甲醇(MeOH)、乙酸乙酯(EtOAc)和正丁醇等试剂均为分析纯(西陇科学股份有限公司);茴香醛显色剂(天津市福辰化学试剂厂);质谱级乙腈(ACN)、甲酸、色谱级乙醇、正己烷(*n*-hexane)(美国 Thermo-Fisher 公司);水为实验室自制超纯水(18.2 MΩ·cm,美国 Millipore 公司)。

(+)-白花前胡甲素和顺式凯琳内酯为课题组前期分离获得[14];(+)-北美芹素(纯度≥98%)、Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)(上海源叶生物科技有限公司);氯化镁($MgCl_2$)、还原型辅酶Ⅱ(NADPH)、葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PD)以及商业化人肝微粒体(美国 Sigma 公司)。

前胡于 2022 年 11 月购自安徽亳州药材市场,由北京大学药学院屠鹏飞教授鉴定为伞形科植物白花前胡的干燥根,标本存放于北京中医药大学北京中医药研究院中药现代研究中心(标本号:2022-SYL-QH1)。

1.2　(+)-PA 和(+)-Pte 在 HLMs 中的体外孵育

体外孵育体系(终体积为 200 μL)由 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)组成,包括 3.3 mmol/L $MgCl_2$、1.0 mmol/L NADPH、5.0 mmol/L G-6-P、1.0 U/mL G-6-PD、1 mg/mL HLMs 及 25 μmol/L 底物((+)-PA 和(+)-Pte)。混合液于 37 ℃恒温振荡(300 r/min)预孵育 5 min 后,加入 1.0 mmol/L NADPH 启动反应。孵育 2 h 后,用 600 μL 的 EtOAc 萃取 3 次,合并上层溶液,氮气吹干。残渣用 50 μL 甲醇复溶,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,进行 LC-MS 分析。另设空白对照组,以等体积甲醇代替底物溶液。

1.3　LC-MS 分析

LC-MS 分析采用 Thermo Ultimate 3000 UHPLC 系统联用 SCIEX TripleTOF 6600$^+$-MS。色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)和乙腈(B);梯度洗脱程序:0~35.0 min, 25%B; 35.0~40.0 min, 25%B~45%B; 40.0~42.0 min, 45%B~57%B; 42.0~48.0 min, 57%B~67%B; 48.0~53.0 min, 67%B~95%B; 53.0~53.1 min, 95%B~25%B; 53.1~59.0 min, 25%B; 柱温:35 ℃; 流速:1.0 mL/min。Analyst TF 1.7(SCIEX)和 Chromeleon(Version 7.2, Thermo-Fisher Scientific)软件分别控制质谱采集和液相程序洗脱。

采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式采集。离子源参数设置:喷雾电压为 5 500 V;气帘气(CUR)、雾化气(GS1)和辅助加热气(GS2)气压分别设为 0.24、0.34 和 0.34 MPa;离子源温度设为 500 ℃。MS^1 全扫描,质量扫描范围为 *m/z* 100~1 000,MS^2 中设定碰撞能量(CE)为 30 eV,质量扫描范围为 *m/z* 50~1 000。PeakView 1.2(SCIEX)软件用于数据处理。

1.4　提取与分离

前胡干燥饮片(5.0 kg),粉碎,用 45 L 95% 乙醇水溶液加热回流提取 3 次,每次 1 h。合并提取液,减压回收溶剂至无醇味,得总浸膏。将浸膏混悬于 5 L 蒸馏水中,依次使用 5 L 石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇萃取,每种溶剂萃取 3 次。各萃取液减压浓缩后,分别得到石油醚(Fr. P)、二氯甲烷、乙酸乙酯(Fr. E)及正丁醇 4 个萃取部位。依据 1.3 节方法,根据肝微粒体代谢产物的保留时间和质谱信息为导向,利用 LC-MS 追踪前胡各萃取部位中的目标成分,根据分析结果选择石油醚部位和乙酸乙酯部位进行后续分离。

取 Fr. E(7.8 g),利用自制硅胶柱(柱子半径(*r*)=2.25 cm,高度(*h*)=20 cm)分步洗脱。首先,以 PE-EtOAc 系统(20∶1→10∶1→5∶1→1∶1,体积比)进行洗脱,随后替换为 DCM-MeOH 系统(20∶1→10∶1→5∶1→0∶1,体积比)进行洗脱。洗脱液经 TLC 检识,将斑点相同的流分合并,编号为 Frs. E1~E11。取 Fr. E6(57.6 mg)利用 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱纯化,以 DCM-MeOH(3∶1,体积比)洗脱,合并相同斑点的流分,编号为 Frs. E6a~E6d。取 Fr. E6b(18.4 mg)进一步利用半制备液相色谱进行手性分离。Chiral INC 正相手性色谱柱Ⅰ(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm,广州菲罗门科学仪器有限公司);流动相,EtOH-正己烷(20∶80,体积比);流速,1.0 mL/min;检测波长,323 nm,分别收集各色谱峰。

取 Fr. P(193.8 g)经硅胶柱(*r*=4.5 cm,*h*=100 cm)分离,依次以 PE-EtOAc 系统(20∶1→10∶1→5∶1→1∶1,体积比)和 DCM-MeOH 系统(20∶1→10∶1→5∶1→0∶1,体积比)梯度洗脱。TLC 检识指导合并,共得到 25 个流分(Frs. P1~P25)。

取 Fr. P16(16.7 g)经硅胶柱(*r*=3.0 cm,*h*=25 cm)分离,以 PE-EtOAc 系统(10∶1→5∶1→1∶1,体积比)梯度洗脱,TLC 检识指导合并,得到 13 个流分(Frs. P16a~P16m)。

取 Fr. P16f(12.0 g)经自制 ODS 反相柱(*r*=2.5 cm,*h*=15 cm)分离,MeOH-H_2O 系统(1∶1→1∶0,体

积比)梯度洗脱,TLC 检识指导,得到 9 个流分(Frs. P16f1~P16f9)。

取 Fr. P16f6(92.4 mg)利用 Sephadex LH-20 色谱柱(瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences 公司)纯化,DCM-MeOH 系统(3∶1,体积比)洗脱,TLC 检识指导合并,得到 2 个流分(Frs. P16f6a 和 P16f6b)。取 Fr. P16f6a(52.8 mg)经 Phenomenex Luna C_{18}(2)色谱柱(250 mm×10 mm,5.0 μm)制备分离,流动相 ACN-H_2O(70∶30,体积比),流速 3.0 mL/min,检测波长 323 nm,共收集到 4 个流分(Frs. P16f6a1~P16f6a4)。

取 Fr. P16f6a3(16.0 mg)经 Waters SunFire OBD Prep 正相制备色谱柱(250 mm × 10 mm,5.0 μm)纯化,流动相 EtOH-正己烷(10∶90,体积比),流速 3.0 mL/min,检测波长 323 nm,分别收集对应色谱峰,获得化合物 3 和 4。化合物 3 经 CHIRALPAK® OX-3 正相手性色谱柱Ⅱ(150 mm×4.6 mm,3.0 μm,日本大赛璐公司)拆分,流动相 EtOH-正己烷(25∶75,体积比),流速 0.5 mL/min,检测波长 323 nm,最终收集流分,制得化合物 3a 和 3b。

化合物 4 经过 Chiral INC 正相手性色谱柱Ⅰ拆分对映体,流动相 EtOH-正己烷(50∶50,体积比),流速 0.7 mL/min,检测波长 323 nm,最终收集流分,制得化合物 4a 和 4b。

Fr. P16g(0.8 g)经硅胶柱(r=1.5 cm,h=16 cm)分离,依次以 PE-EtOAc 系统(20∶1→10∶1→5∶1→1∶1,体积比)和 DCM-MeOH 系统(10∶1→5∶1→0∶1,体积比)梯度洗脱,TLC 检识指导合并,共得到 11 个流分(Frs. P16g1~P16g11)。

取 Fr. P16g6(153.2 mg)经 ODS 反相柱(r=1.0 cm,h=13 cm)分离,经 MeOH-H_2O(1∶3→1∶1→1∶0)梯度洗脱,TLC 检识指导合并,共得到 17 个流分(Frs. P16g6a~P16g6q)。其中,Fr. P16g6j(23.8 mg),经 Phenomenex Luna C_{18}(2)反相制备液相色谱柱纯化,流动相 ACN-H_2O(40∶60,体积比),流速 3.0 mL/min,检测波长 323 nm,最终制得化合物 5。

2 结果与讨论

2.1 (+)-PA 和(+)-Pte 的体外孵育产物鉴定

将(+)-PA 和(+)-Pte 分别与 HLMs 共孵育,获得二者体外代谢产物,见如图 1。结果显示,在(+)-PA 和(+)-Pte 体系中分别检测到 8 个(A1~A8)和 9 个(E1~E9)代谢产物,上述代谢产物的色谱和质谱数据见表 1 和表 2。通过总结 APs 质谱裂解规律,初步推断代谢产物结构,进一步通过与后续前胡药材中分离获得的标准品进行比对,实现部分代谢产物结构的准确鉴定。

2.1.1 基于特征碎片离子的位置异构体区分

代谢产物中存在多组易发生互变的位置异构

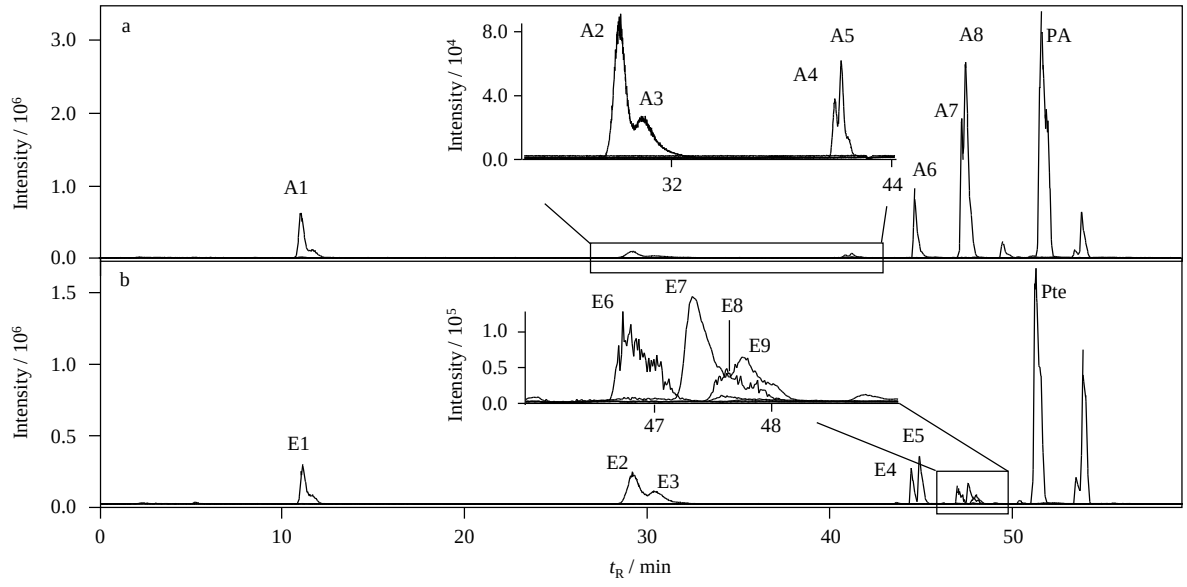


图 1 HLMs 中(a)(+)-PA 和(b)(+)-Pte 代谢产物的提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion current chromatograms of incubates for (a) (+)-praeruptorin A (PA) and (b) (+)-pteryxin (Pte) in human liver microsomes (HLMs)

Metabolites A1–A8 originated from the incubation of (+)-PA; E1–E9 originated from the incubation of (+)-Pte in HLMs.

体(如前胡香豆素 B/C),难以实现良好的色谱分离,仅凭保留时间无法准确指认。本研究利用 APs 化合物在 ESI 下的特征裂解规律进行区分[9]:母离子经碰撞诱导解离(CID)后,会在母核吡喃环 C-4′处优先发生中性丢失,产生特征碎片离子,再进一步中性丢失 C-3′处取代基,产生其他特征碎片离子。因此,首先根据母离子 C-4′处中性丢失所产生的特征碎片离子可以确定 C-4′处取代基,进一步确定 C-3′处取代基,实现位置异构体的区分,具体如下(图 2 和图 3):(1)当 C-4′为羟基时(如前胡香豆素 B),$[M+NH_4]^+$离子易丢失 NH_3 和 H_2O,生成 *m/z* 287.092 7 的特征碎片离子;(2)当 C-4′为乙酰氧基时(如前胡香豆素 C),$[M+NH_4]^+$离子易丢失 NH_3 和 CH_3COOH,产生 *m/z* 245.082 2 的特征碎片离子。以上规律为后续异构体代谢产物的精准鉴定提供依据。

2.1.2　(+)-PA 的代谢产物鉴定

(+)-PA 的 8 个代谢产物中,包括 3 个水解产物(A1~A3)和 5 个氧化产物(A4~A8),见图 4 和表 1。

代谢产物 A1(t_R=11.0 min)的准分子离子峰为 *m/z* 263.092 1 $[M+H]^+$。经对照品比对,其保留时间和质谱裂解行为与顺式凯琳内酯完全一致,故将 A1 准确鉴定为顺式凯琳内酯。

代谢产物 A2(t_R=29.1 min)和 A3(t_R=30.3 min)为一组同分异构体。基于上述质谱裂解规律,通过检测特征碎片 *m/z* 245.082 2 和 287.092 7,结合对照品保留时间,将 A2 和 A3 分别鉴定为前胡香豆素 C 和前胡香豆素 B。

代谢产物 A4(t_R=40.7 min)和 A5(t_R=40.9 min)母离子均为 *m/z* 443.131 3 $[M+Na]^+$($C_{21}H_{24}O_9$,误差 1.0×10^{-7})。MS^2 中,二者均产生 *m/z* 383.11 的碎片,对应 C-4′位中性丢失一分子乙酸,表明 C-4′位结构完整;随后产生 *m/z* 251.07 碎片提示氧化反应发生于 C-3′侧链。据此推断 A4 和 A5 为 C-3′侧链双羟基化产物。

代谢产物 A6(t_R=44.5 min)、A7(t_R=47.0 min)和 A8(t_R=47.3 min)母离子均为 *m/z* 425.120 0 $[M+Na]^+$($C_{21}H_{22}O_8$,误差 -1.6×10^{-6}),推测为单氧化产物。其中,A7 与对照品 5 具有一致的保留时间和质谱裂解行为,故将产物 A7 鉴定为 isoepoxypteryxin,并进一步推测 A6 和 A8 为侧链其他位点的氧化异构体。

2.1.3　(+)-Pte 的代谢产物鉴定

本研究阐明了(+)-Pte 在 HLMs 中的Ⅰ相代谢

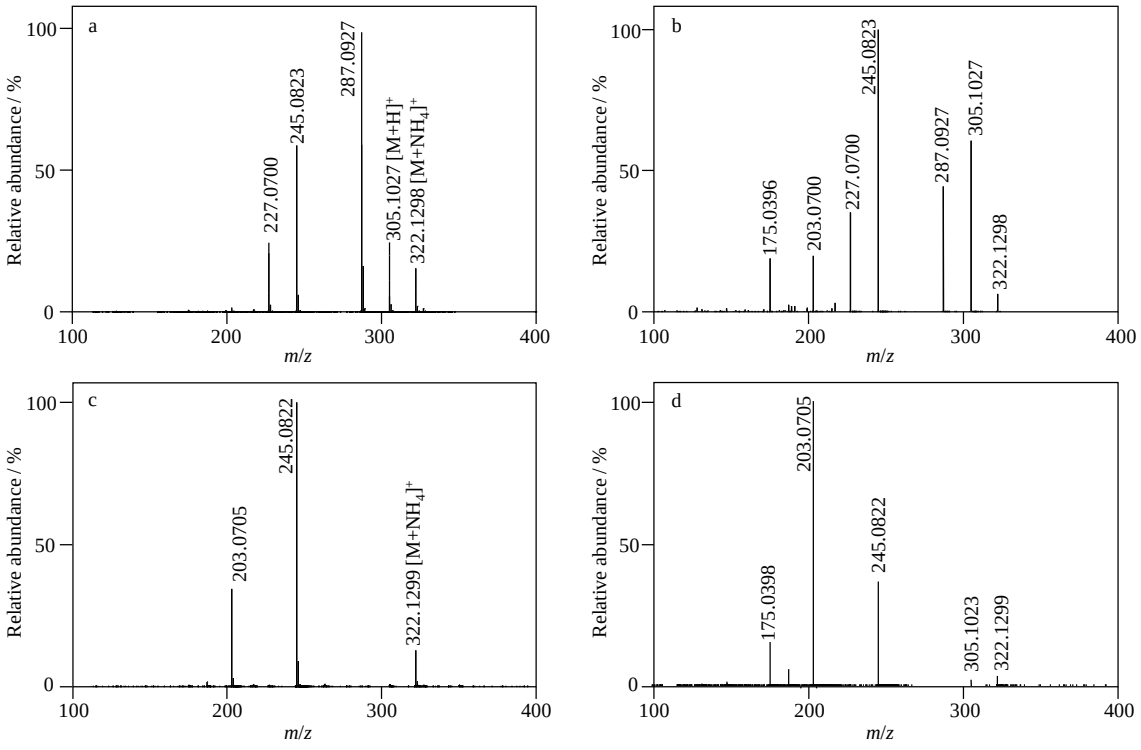


图 2　前胡香豆素 B 的(a)MS^1和(b)MS^2质谱图以及前胡香豆素 C 的(c)MS^1和(d)MS^2质谱图

Fig. 2　(a) MS^1 and (b) MS^2 spectra of qianhucoumarin B; (c) MS^1 and (d) MS^2 spectra of qianhucoumarin C

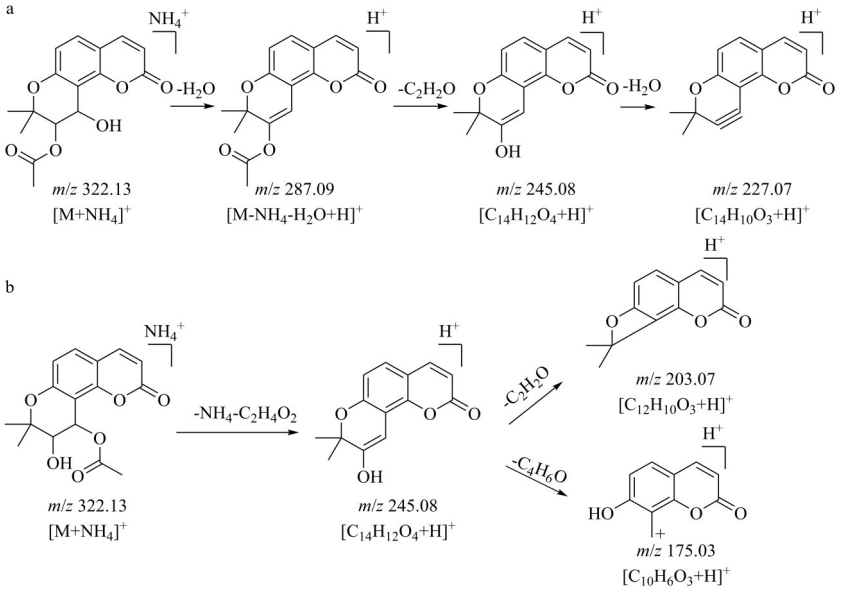


图 3 (a)前胡香豆素 B 和(b)前胡香豆素 C 可能的裂解途径

Fig. 3 Proposed mass fragmentation pathways for qianhucoumarins (a) B and (b) C

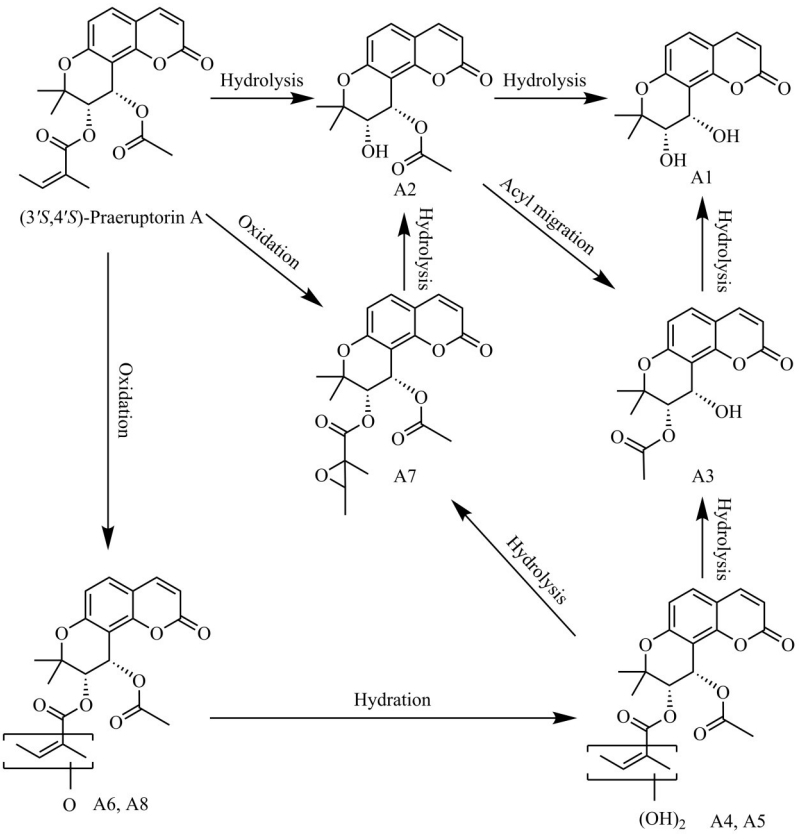


图 4 (+)-PA 在 HLMs 中可能的代谢途径

Fig. 4 Proposed metabolism pathways of (+)-PA in HLMs

过程,共鉴定出 9 个代谢产物,包括 5 个水解产物(E1~E3、E6、E8)和 4 个氧化产物(E4、E5、E7、E9),见图 5 和表 2。

代谢产物 E1、E2 和 E3 分别与(+)-PA 的代谢产物 A1、A2 和 A3 对应,表明二者存在共同的水解代谢途径。代谢产物 E6(t_R=46.8 min)和 E8(t_R=47.6 min)为另一组位置异构体。E6 和 E8 分别与对照品 4 和 3 具有一致的保留时间和质谱裂解行

表 1　(+)-PA 及其代谢产物(A1~A8)的色谱和质谱数据
Table 1　Chromatographic and MS/MS data of (+)-PA and its metabolites (A1−A8)

Compound	t_R/min	Formula	MS^1 (m/z) (quasimolecular ion)	Error/ 10^{-6}	MS^2 (m/z)
(+)-PA	51.4	$C_{21}H_{22}O_7$	404.1706 $[M+NH_4]^+$	0.5	327.1251, 227.0701
			409.1255 $[M+Na]^+$	−1.0	349.1029, 327.1215, 227.0695, 215.0685
A1	11.0	$C_{14}H_{14}O_5$	263.0921 $[M+H]^+$	2.7	203.0697, 187.0379, 175.0385
			280.1180 $[M+NH_4]^+$	0.2	263.0912, 203.0696, 175.0386
A2	29.1	$C_{16}H_{16}O_6$	322.1289 $[M+NH_4]^+$	1.2	245.0804, 203.0695, 187.0376, 175.0385
			327.0842 $[M+Na]^+$	0.9	267.0629, 203.0700
A3	30.3	$C_{16}H_{16}O_6$	322.1281 $[M+NH_4]^+$	−1.3	305.1028, 287.0920, 245.0816, 227.0711, 203.0700, 175.0396
			327.0834 $[M+Na]^+$	−1.6	287.0918, 203.0702
A4	40.7	$C_{21}H_{24}O_9$	438.1761 $[M+NH_4]^+$	0.6	361.1271, 245.0799, 227.0698
			443.1313 $[M+Na]^+$	0.1	383.1073, 251.0670, 245.0802, 227.0691
A5	40.9	$C_{21}H_{24}O_9$	438.1757 $[M+NH_4]^+$	−0.4	361.1269, 317.0998, 245.0803, 227.0701, 175.0384
			443.1313 $[M+Na]^+$	0.1	383.1084, 251.0677, 245.0807, 227.0693
A6	44.5	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1651 $[M+NH_4]^+$	−0.5	343.1171, 325.1081, 245.0802, 227.0690, 175.0365
			425.1200 $[M+Na]^+$	−1.6	343.1163, 267.0611, 245.0787, 227.0680, 175.0373
A7	47.0	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1659 $[M+NH_4]^+$	1.4	343.1164, 315.1214, 299.0910, 255.1004, 245.0809, 227.0701
			425.1211 $[M+Na]^+$	1.0	365.0983, 245.0709, 227.0698
A8	47.3	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1649 $[M+NH_4]^+$	−0.9	343.1168, 255.1009, 245.0804, 227.0699, 175.0382
			425.1202 $[M+Na]^+$	−1.1	365.0980, 245.0800, 227.0696

为,故将 E6 和 E8 分别鉴定为 3′-羟基-4′-当归酰氧基-3′,4′-二氢邪蒿内酯和 3′-当归酰氧基-4′-羟基-3′,4′-二氢邪蒿内酯。此外,氧化产物 E4(t_R=44.2 min)、E5(t_R=44.7 min)、E7(t_R=47.3 min)和 E9(t_R=47.8 min)的质谱特征提示其氧化位点主要位于 C-4′位的当归酰氧基侧链。

2.2　前胡提取物中原型成分的分离及结构鉴定

通过对体外代谢产物数据进行分析,表明目标化合物主要富集于石油醚部位(193.8 g)和乙酸乙酯部位(7.8 g),其余二氯甲烷部位(11.0 g)及正丁醇部位(30.3 g)中目标成分含量较低。通过对上述两个部位的系统分离,共得到 9 个 APs(图 6)。

从乙酸乙酯部位中分离得到 4 个 APs(图 7),分别为 1a(7.1 mg, t_R=12.2 min)、2a(2.9 mg, t_R=14.0 min)、2b(0.5 mg, t_R=14.6 min)和 1b(2.1 mg, t_R=16.1 min)。从石油醚部位分离得到 5 个 APs,分别为 3a(1.0 mg, t_R=6.8 min)、3b(0.6 mg, t_R=8.5 min)、4a(4.4 mg, t_R=5.0 min)、4b(2.0 mg, t_R=7.3 min)和 5(7.5 mg, t_R=24.6 min)。其中,化合物 1b、2b 为已知平面结构的新构型。

通过 ^{1}H、^{13}C-NMR 等波谱技术鉴定化合物平面结构,按照文献[15]方法,通过 Ⅰ 相代谢水解反应获得共同产物凯琳内酯,根据凯琳内酯的绝对构型确定化合物的绝对构型,故将化合物 1~5 分别鉴定为(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆素 C(1a/1b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆素 B(2a/2b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-3′-当归酰氧基-4′-羟基-3′,4′-二氢邪蒿内酯(3a/3b)、(3′*S*,4′*S*)-和(3′*R*,4′*R*)-3′-羟基-4′-当归酰氧基-3′,4′-二氢邪蒿内酯(4a/4b)和(3′*S*,4′*S*)-isoepoxypteryxin(5)。

化合物 1(1a/1b)白色粉末;ESI-MS *m/z* 327.085 4 $[M+Na]^+$,分子式为 $C_{16}H_{16}O_6$(理论值为 *m/z* 327.038 9,误差 $+4.6\times10^{-6}$)。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.61 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.35 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6), 6.43 (1H, d, *J*=4.7 Hz, H-4′), 6.23 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 4.00 (1H, d, *J*=4.7 Hz, H-3′), 2.23 (3H, s, 2‴-CH_3), 1.46 (3H, s, 5′-CH_3), 1.44 (3H, s, 6′-CH_3)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 159.9 (C-2), 113.0 (C-3), 143.3 (C-4), 129.2 (C-5), 114.5 (C-6), 157.0 (C-7), 106.9 (C-8), 154.3 (C-9), 112.4 (C-10), 78.8 (C-2′), 71.2 (C-3′), 63.0 (C-4′), 25.2 (C-5′), 21.6 (C-6′), 172.0 (C-1‴), 20.9 (C-2″)。以上数据与文献报道基本一致[11],将化合物 1a 和 1b 分别鉴定为(3′*S*,4′*S*)-前胡香豆素 C 和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆

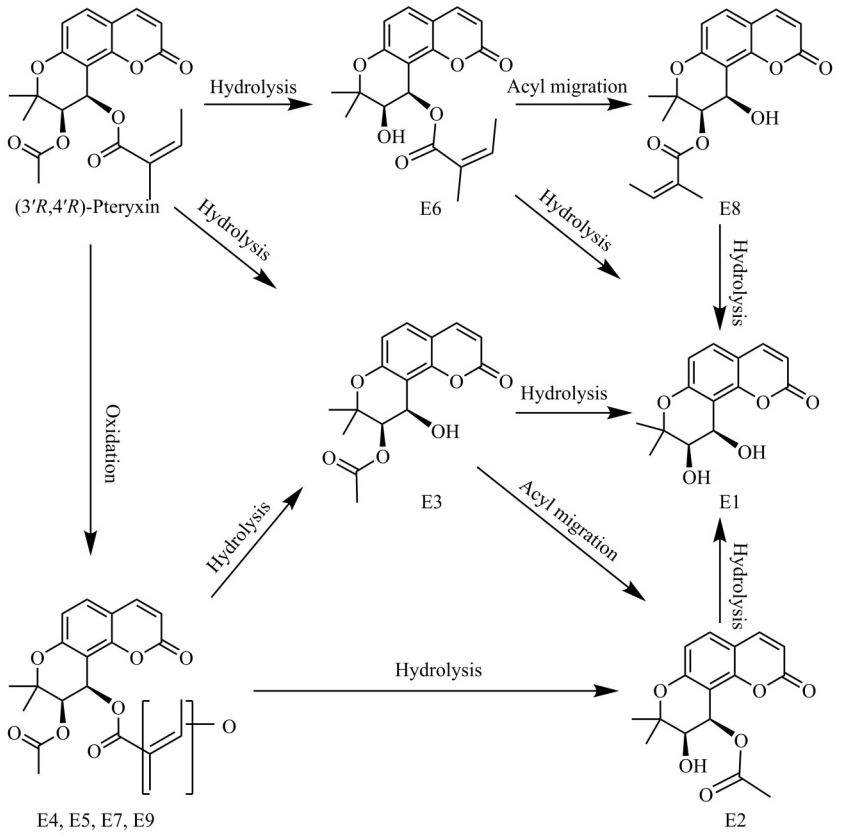


图 5 (+)-Pte 在 HLMs 中可能的代谢途径

Fig. 5 Proposed metabolism pathways of (+)-Pte in HLMs

表 2 (+)-Pte 及其代谢产物(E1~E9)的色谱和质谱数据

Table 2 Chromatographic and MS/MS data of (+)-Pte and its metabolites (E1–E9)

Compound	t_R/min	Formula	MS^1 (*m/z*) (quasimolecular ion)	Error /10^{-6}	MS^2 (*m/z*)
(+)-Pte	51.0	$C_{21}H_{22}O_7$	404.1705 $[M+NH_4]^+$	0.3	287.0903, 245.0797, 227.0693, 175.0382
			409.1264 $[M+Na]^+$	1.5	309.0729, 245.0805, 227.0693, 175.0381
E1	11.0	$C_{14}H_{14}O_5$	263.0923 $[M+H]^+$	3.4	203.0694, 175.0379
			280.1183 $[M+NH_4]^+$	1.3	263.0895, 245.0796, 203.0691, 187.0387, 175.0383
E2	29.1	$C_{16}H_{16}O_6$	322.1288 $[M+NH_4]^+$	0.9	245.0794, 203.0694, 187.0377, 175.0366
			327.0844 $[M+Na]^+$	1.5	267.0611, 203.0688, 187.0436, 175.0380
E3	30.3	$C_{16}H_{16}O_6$	322.1283 $[M+NH_4]^+$	−0.7	305.1026, 287.0921, 245.0815, 227.0706, 203.0699, 175.0388
			327.0840 $[M+Na]^+$	0.3	287.0924, 203.0696
E4	44.2	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1654 $[M+NH_4]^+$	0.3	287.0901, 245.0798, 227.0696, 175.0373
			425.1209 $[M+Na]^+$	0.5	309.0724, 245.0798, 227.0689, 175.0378
E5	44.7	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1660 $[M+NH_4]^+$	1.7	287.0902, 245.0803, 227.0695, 175.0379
			425.1202 $[M+Na]^+$	−1.1	365.0980, 245.0800, 227.0696
E6	46.8	$C_{19}H_{20}O_6$	362.1608 $[M+NH_4]^+$	2.7	245.0806, 203.0707, 187.0386, 175.0384
			367.1160 $[M+Na]^+$	2.2	267.0624, 203.0693
E7	47.3	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1655 $[M+NH_4]^+$	0.5	287.0903, 245.0801, 227.0691, 175.0380
			425.1208 $[M+Na]^+$	0.3	309.0708, 245.0805, 227.0682
E8	47.6	$C_{19}H_{20}O_6$	362.1606 $[M+NH_4]^+$	2.2	345.1317, 327.1219, 227.0696, 349.1035, 267.0619
			367.1159 $[M+Na]^+$	−4.7	
E9	47.8	$C_{21}H_{22}O_8$	420.1647 $[M+NH_4]^+$	−1.4	287.0897, 245.0794, 227.0689,
			425.1196 $[M+Na]^+$	−2.6	367.1176, 309.0723, 245.0768, 227.0703

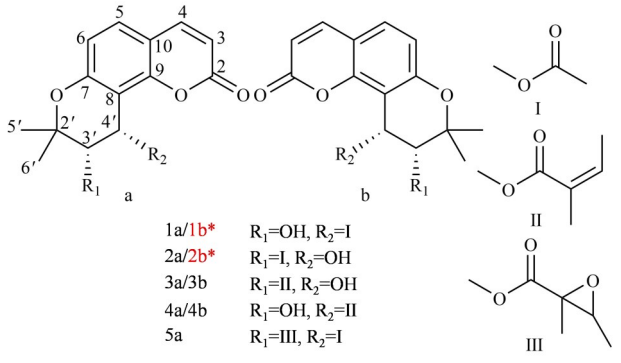


图 6　角型吡喃香豆素 1~5 的化学结构

Fig. 6　Chemical structures of angular-type pyranocoumarins 1–5

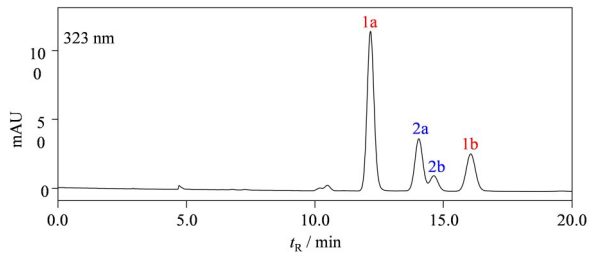


图 7　化合物 1 和 2 的对映体拆分色谱图

Fig. 7　Chromatogram of the enantiomeric separation for compounds 1 and 2

Mobile phase: EtOH-*n*-hexane=20∶80 (volume ratio); column: Chiral INC (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); flow rate: 1.0 mL/min.

1a. (3′*S*, 4′*S*)-qianhucoumarin C; 1b. (3′*R*, 4′*R*)-qianhucoumarin C; 2a. (3′*S*, 4′*S*)-qianhucoumarin B; 2b. (3′*R*, 4′*R*)-qianhucoumarin B.

素 C。

化合物 2(2a/2b)白色粉末;ESI-MS *m/z* 327.085 7 [M+Na]$^+$,分子式为 $C_{16}H_{16}O_6$(理论值为 *m/z* 327.038 9,误差+5.5×10^{-6})。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.64 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.34 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6), 6.26 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 5.42 (1H, d, *J*=4.9 Hz, H-3′), 5.19 (1H, d, *J*=4.9 Hz, H-4′), 2.18 (3H, s, 2″-CH_3), 1.48 (3H, s, 5′-CH_3), 1.40 (3H, s, 6′-CH_3)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 160.3 (C-2), 112.7 (C-3), 143.8 (C-4), 128.7 (C-5), 114.7 (C-6), 155.9 (C-7), 110.1 (C-8), 154.4 (C-9), 112.3 (C-10), 77.7 (C-2′), 72.6 (C-3′), 60.2 (C-4′), 25.3 (C-5′), 22.6 (C-6′), 170.3 (C-1″), 20.7 (C-2″)。以上数据与文献报道基本一致[11],将化合物 2a 和 2b 分别鉴定为(3′*S*, 4′*S*)-前胡香豆素 B 和(3′*R*,4′*R*)-前胡香豆素 B。

化合物 3(3a/3b)白色粉末;ESI-MS *m/z* 367.117 4 [M+Na]$^+$,分子式 $C_{19}H_{20}O_6$(理论值为 *m/z* 367.115 2,误差+6.0×10^{-6})。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ_H 7.64 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.34 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6), 6.21 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 6.16 (1H, d, *J*=7.2 Hz, H-3″), 5.47 (1H, d, *J*=4.8 Hz, H-3′), 5.22 (1H, d, *J*=4.8 Hz, H-4′), 2.00 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-4″), 1.94 (3H, s, H-5″), 1.51 (3H, s, 5′-CH_3), 1.44 (3H, s, 6′-CH_3)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ_C 160.6 (C-2), 112.4 (C-3), 143.9 (C-4), 128.7 (C-5), 114.4 (C-6), 156.0 (C-7), 110.8 (C-8), 154.1 (C-9), 112.4 (C-10), 77.6 (C-2′), 72.4 (C-3′), 59.9 (C-4′), 25.6 (C-5′), 22.4 (C-6′), 166.9 (C-1″), 139.3 (C-2″), 127.2 (C-3″), 20.5 (C-4″), 15.8 (C-5″)。以上数据与文献报道基本一致[15],将化合物 3a 和 3b 分别鉴定为(3′*S*, 4′*S*)-3′-当归酰氧基-4′-羟基-3′,4′-二氢邪蒿内酯和(3′*R*,4′*R*)-3′-当归酰氧基-4′-羟基-3′,4′-二氢邪蒿内酯。

化合物 4(4a/4b)白色粉末;ESI-MS *m/z* 367.117 1 [M+Na]$^+$,分子式 $C_{19}H_{20}O_6$(理论值为 *m/z* 367.115 2,误差+5.1×10^{-6})。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.60 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.35 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-5), 6.80 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6), 6.49 (1H, d, *J*=4.7 Hz, H-4′), 6.22 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 6.10 (1H, m, *J*=7.2 Hz, H-3‴), 4.08 (1H, d, *J*=4.7 Hz, H-3′), 2.00 (3H, d, *J*=7.2 Hz, H-4‴), 1.89 (3H, s, H-5‴), 1.49 (3H, s, 5′-CH_3), 1.44 (3H, s, 6′-CH_3)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 160.0 (C-2), 112.8 (C-3), 143.3 (C-4), 129.1 (C-5), 114.4 (C-6), 156.9 (C-7), 107.2 (C-8), 154.1 (C-9), 112.1 (C-10), 78.5 (C-2′), 71.4 (C-3′), 63.3 (C-4′), 25.6 (C-5′), 20.8 (C-6′), 168.1 (C-1‴), 138.8 (C-2‴), 127.3 (C-3‴), 20.2 (C-4‴), 15.7 (C-5‴)。以上数据与文献报道基本一致[15],将化合物 4a 和 4b 分别鉴定为(3′*S*,4′*S*)-3′-羟基-4′-当归酰氧基-3′,4′-二氢邪蒿内酯和(3′*R*,4′*R*)-3′-羟基-4′-当归酰氧基-3′,4′-二氢邪蒿内酯。

化合物 5 白色粉末;ESI-MS *m/z* 425.119 2 [M+Na]$^+$,分子式为 $C_{21}H_{22}O_8$(理论值为 *m/z* 425.120 7,误差−3.5×10^{-6})。^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ_H 7.60 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4), 7.36 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-

5), 6.81 (1H, d, *J*=8.6 Hz, H-6), 6.61 (1H, d, *J*=4.8 Hz, H-4′), 6.25 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 5.42 (1H, d, *J*=4.8 Hz, H-3′), 3.05 (1H, q, *J*=5.4 Hz, H-3″), 2.15 (3H, s, H-2‴), 1.48 (3H, s, H-5″), 1.45 (3H, s, 5′-CH_3), 1.41 (3H, s, 6′-CH_3), 1.32 (3H, d, *J*=5.4 Hz, H-4″)。^{13}C-NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): δ_C 170.1 (C-1″), 169.1 (C-1‴), 160.0 (C-2), 156.7 (C-7), 154.0 (C-9), 143.5 (C-4), 129.4 (C-5), 114.6 (C-6), 113.4 (C-3), 112.7 (C-10), 106.9 (C-8), 77.6 (C-2′), 71.4 (C-3′), 60.9 (C-2″), 60.7 (C-3″), 59.7 (C-4′), 25.3 (C-5′), 22.9 (C-6′), 20.8 (C-2‴), 19.4 (C-5″), 13.9 (C-4″)。以上数据与文献报道一致[12],将化合物 5 鉴定为(3′*S*,4′*S*)-isoepoxypteryxin。

3 结论

本研究构建并验证了一种以“体外代谢产物导向-原药材靶向分离-代谢产物确证”的策略,成功解决了前胡中活性成分角型吡喃香豆素代谢研究中缺乏对照品的难题。利用该策略,本研究通过从前胡原药材中定向捕获并制备了 9 个对照品,促进前胡中 APs 的高效分离,其中,化合物 1b、2b 为已知平面结构的新构型。实现了对微量代谢产物(特别是立体异构体)的精准结构鉴定,阐明了(+)-PA 与(+)-Pte 在 HLMs 及体内的代谢路径。研究结果明确了水解、氧化及酰基迁移为 APs 的主要代谢途径,并揭示了(+)-PA 与(+)-Pte 的代谢差异。此方法不仅深化了 APs 的代谢机理,也为中药复杂成分微量代谢产物的结构鉴定与对照品获取提供了参考。

参考文献:

[1] Huang W Q, Yan Y R, Tian W S, et al. Nat Commun, 2025, 16(1): 882

[2] Liu X, Liu Y Y, Xu X P, et al. Acta Pharm Sin B, 2024, 14(5): 2333

[3] Song Y L, Zeng K W, Jiang Y, et al. Med Res Rev, 2021, 41(3): 1539

[4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2025: 285
国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2025: 285

[5] Li Z K, Zhang F R, Wang S C, et al. Bioengineered, 2022, 13(4): 10038

[6] Wang S, Shi Y H, Wang R, et al. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2022, 56(9): 89
王帅, 石燕红, 王瑞, 等. 上海中医药杂志, 2022, 56(9): 89

[7] Song Y L, Jing W H, Zhao H Y, et al. Xenobiotica, 2012, 42(3): 231

[8] Song Y L, Yan R, Jing W H, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2011, 25(6): 719

[9] Gong X C, Liu W J, Cao Y, et al. J Chromatogr A, 2022, 1678: 463360

[10] Song Y L, Jing W H, Chen Y G, et al. J Pharm Biomed Anal, 2014, 93: 86

[11] Kong L Y, Pei Y H, Li X, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 1993, 28(10): 772
孔令义, 裴月湖, 李铣, 等. 药学学报, 1993, 28(10): 772

[12] Liu D P. [MS Dissertation]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine, 2021
刘定平. [硕士学位论文]. 南昌: 江西中医药大学, 2021

[13] Kong L Y, Li X, Pei Y H, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 1994, 29(1): 49
孔令义, 李铣, 裴月湖, 等. 药学学报, 1994, 29(1): 49

[14] Yang Y, Gong X C, Tu P F, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 2024, 59(8): 2343
杨阳, 龚兴成, 屠鹏飞, 等. 药学学报, 2024, 59(8): 2343

[15] Song Y L, Zhang Q W, Li Y P, et al. Molecules, 2012, 17(4): 4236