

手性色谱-质谱联用导向的前胡中角型吡喃香豆素类化合物分离

杨 阳^{1,2#}, 龚兴成^{1,2#}, 屠鹏飞¹, 刘文静^{3*}, 宋月林^{1*}

(1. 北京中医药大学, 北京中医药研究院中药现代研究中心, 北京 102400; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102400; 3. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 本研究根据手性色谱-质谱联用导向策略, 在利用质谱数据精准识别中药前胡 (*Peucedani Radix*) 中角型吡喃香豆素类化合物 (angular-type pyranocoumarins, APs) 的基础上, 采用硅胶、ODS、Sephadex LH-20、非手性 (手性) 半制备液相色谱等技术从乙酸乙酯部位中共分离得到 16 个 APs, 通过 ¹H、¹³C NMR 等技术, 分别鉴定为 (3'S)-3'-(2-methyl-butyryl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**1A**)、(3'R)-3'-(2-methyl-butyryl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**1B**)、(3'S)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatin (**2A**)、(3'R)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatin (**2B**)、(3'S)-3'-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**3A**)、(3'R)-3'-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**3B**)、(3'S,4'S)-白花前胡乙素 (**4A**)、(3'R,4'R)-白花前胡乙素 (**4B**)、(3'S,4'S)-白花前胡素 E (**5A**)、(3'R,4'R)-白花前胡素 E (**5B**)、3'-isovaleryl-4'-angeloyl-*cis*-khellactone (**6**)、3'-angeloyl-4'-(2-methyl-butyryl)-*cis*-khellactone (**7**)、(3'S,4'S)-白花前胡甲素 (**8A**)、(3'R,4'R)-白花前胡甲素 (**8B**)、(3'S,4'S)-凯林内酯 (**9A**) 和 (3'R,4'R)-凯林内酯 (**9B**)。其中, 化合物 **1A**、**1B** 为新化合物, 化合物 **2A** 为已知平面结构的新构型, 化合物 **2A**、**2B** 为首次从前胡中分离得到。因此, 基于手性 LC-MS 的成分分析和导向分离, 有利于快速发现中药中新化合物, 为新颖结构, 特别是对映异构体的分离提供了有效手段。

关键词: 前胡; 化学成分; 角型吡喃香豆素; 手性色谱-质谱联用导向分离; 对映异构体

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)08-2343-07

Chiral LC-MS-guided isolation of angular-type pyranocoumarins from *Peucedani Radix*

YANG Yang^{1,2#}, GONG Xing-cheng^{1,2#}, TU Peng-fei¹, LIU Wen-jing^{3*}, SONG Yue-lin^{1*}

(1. *Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China;* 2. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102400, China;* 3. *School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*)

Abstract: This study utilized a chiral liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)-guided isolation strategy to accurately capture angular-type pyranocoumarins (APs) in *Peucedani Radix* (Chinese name: Qianhu). Sixteen APs were successfully purified from the ethyl acetate extract of *Peucedani Radix* through deploying various techniques such as silica gel, ODS, Sephadex LH-20, and achiral (chiral) semi-preparative liquid chromatography. After extensive structural measurements, such as ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, their structures were identified as (3'S)-3'-(2-methyl-butyryl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**1A**), (3'R)-3'-(2-methyl-butyryl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**1B**), (3'S)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatin (**2A**), (3'R)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatin (**2B**), (3'S)-3'-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**3A**), (3'R)-3'-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin (**3B**), (3'S,4'S)-praeurptorin B

收稿日期: 2024-01-29; 修回日期: 2024-04-27.

基金项目: 中组部“万人计划”-青年拔尖人才; 河南中医药大学仲景青年学者项目 (00104311-2023-85).

#共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: liuwj107@163.com; syltwc2005@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0085

(4A), (3'R,4'R)-praeruptorin B (4B), (3'S,4'S)-praeruptorin E (5A), (3'R,4'R)-praeruptorin E (5B), 3'-isovaleryl-4'-angeloyl-*cis*-khellactone (6), 3'-angeloyl-4'-(2-methyl-butylroyl)-*cis*-khellactone (7), (3'S,4'S)-praeruptorin A (8A), (3'R,4'R)-praeruptorin A (8B), (3'S,4'S)-khellactone (9A), and (3'R,4'R)-khellactone (9B), respectively. Thereof, compounds 1A and 1B were new compounds, while compound 2A represents a new configuration for a known planar structure. Compounds 2A and 2B were isolated for the first time from Peucedani Radix. Above all, chiral LC-MS-guided isolation strategy is advantageous at rapid capturing new compounds from herbal medicines, providing an effective means for the separation of novel structures, especially new enantiomers.

Key words: Peucedani Radix; chemical component; angular-type pyranocoumarins; chiral LC-MS-guided isolation; enantiomer

液相色谱-质谱 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 联用技术, 结合了液相色谱强大的分离能力和质谱的结构鉴定功能, 在药物分析^[1,2]、食品分析^[3]和环境分析^[4]等领域得到了广泛的应用。随着仪器设备的发展及新方法、新技术的不断涌现, 以 LC-MS 为基础的导向分离策略大大提高了中药及天然药物中新化合物发现的效率。Ma 等^[5]通过分析 microphyline A 和 microphyline D 的质谱裂解规律, 采用中性丢失扫描模式, 检测能够中性丢失 136.0 Da (C₁₀H₁₆) 的化合物信息。根据 LC-MS 检测结果, 导向性地从小叶九里香中分离得到了 15 个结构新颖的单萜吡啶类生物碱^[5]。Pang 等^[6]使用 LC-MS 分析龙血竭乙酸乙酯部位, 快速筛选 *m/z* 在 400~800 之间的流分, 从龙血竭中分离得到 2 个具有抗炎活性的二氢查耳烷环合型三聚体。

前胡 (Peucedani Radix) 为伞形科植物白花前胡的干燥根, 主要药效化学成分为角型吡喃香豆素类化合物 (angular-type pyranocoumarins, APs)。现代药理研究表明 APs 类化合物具有祛痰、止咳、保护心血管、抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种药理活性^[7-9]。APs 类化合物在吡喃环上 C-3' 和 C-4' 处常存在手性中心, 进而衍生出一系列对映异构体, 给 LC-MS 导向分离策略的应用带来了较大的挑战。这些对映体之间不仅存在含量差异, 而且存在活性差异。如 (+)-白花前胡甲素 (*d*-PA, (3'S,4'S)-praeruptorin A) 和 (-)-白花前胡甲素 (*l*-PA, (3'R,4'R)-praeruptorin A), 前胡中 *d*-PA 的含量高于 *l*-PA, 并且舒张血管的活性也强于 *l*-PA^[10,11]。课题组前期研究表明 CHIRALPAK® AD-RH 等手性色谱柱可以实现 APs 对映异构体的有效分离^[12]。因此, 本研究借助手性 LC-MS 分析开展了前胡中 APs 类化合物及其对映体的导向分离和结构鉴定, 共分离得到 16 个 APs 类化合物, 包括 7 组对映体。其中, 化合物 1A、1B 为新化合物, 化合物 2A 为已知平面结构的新构型, 化合物 2A、2B 为首次从前胡中分离得到。化合物 1 和 2 结构见图 1。

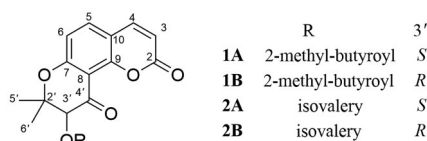


Figure 1 Structures of compounds 1A, 1B, 2A, and 2B

结果与讨论

1 潜在 APs 类新化合物的发现

通过前期对前胡化学成分的全面分析^[13-15]发现 APs 在电喷雾离子源处易形成 [M+H]⁺、[M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺ 和 [M+K]⁺ 等加合离子峰, 在 MS¹ 图谱中检观察到相差 17、5 及 16 Da 的母离子信号。母离子经碰撞诱导解离 (CID), 常在母核吡喃环上 C-3' 和 C-4' 处发生中性丢失, 产生 *m/z* 245、227 或 243 等特征碎片离子。根据以上信息, 对前胡提取物石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯及正丁醇部位进行非手性 LC-MS 分析, 发现乙酸乙酯部位中存在丰富的 APs 类化合物。故对乙酸乙酯部继续导向分离, 采用非手性-手性 LC-MS 追踪, 发现 Fr. 2C、Fr. 3D、Fr. 5B 和 Fr. 9F 中存在 APs 类化合物, 并且多为一对对映异构体同时出现, 采用 Sephadex LH-20、ODS、半制备液相色谱及手性色谱等方法对目标化合物进行分离纯化。

2 结构鉴定

化合物 1、2: 白色粉末; ESI-MS *m/z* 367.115 0 [M+Na]⁺, 分子式为 C₁₉H₂₀O₆, (Calcd.: 367.115 2, -0.54 ppm)。化合物 1&2 在色谱和质谱信号中仅显示为一个信号, 但是在 ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) 和 ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) 图谱中, 却显示出两组非常相似的信号。进一步分析化合物 1 的 HSQC 和 HMBC 图谱, 对核磁共振数据进行归属: ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ_H 7.61 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 6.31 (1H, d, *J* = 9.5 Hz), 5.56 (1H, s), 2.56 (1H, m), 1.78 (1H, m), 1.56 (1H, m), 1.56 (3H, s), 1.39 (3H, s), 1.27 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.98 (3H, t, *J* = 7.4 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ_C 184.4, 175.3,

162.1, 159.7, 153.8, 143.0, 134.6, 115.0, 114.3, 113.0, 108.4, 82.5, 76.2, 41.2, 26.4, 26.8, 11.8, 19.6, 16.9。根据以上信号推测其为典型的 APs 类, 母核为 4'-oxo-3',4'-dihydroseselin。在 HMBC 谱中 (图 2), 观察到 δ_{H} 1.78、1.56 与 δ_{C} 175.3 (C-1'') 相关; δ_{H} 0.98 与 δ_{C} 41.2 (C-2'') 相关; δ_{H} 1.27 同时与 δ_{C} 175.3 (C-1'') 和 δ_{C} 26.8 (C-3'') 相关, 从而推测 3' 位的取代基为 2-甲基-丁酰氧基, 因此, 鉴定化合物 **1** 的平面结构为 3'-(2-methyl-butyroyl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin。进一步根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将 **1A** 和 **1B** 分别鉴定为 (3'*S*)-3'-(2-methyl-butyroyl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin 和 (3'*R*)-3'-(2-methyl-butyroyl)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin。

而图谱中的另一组信号归属为: ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 7.61 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 6.31 (1H, d, $J = 9.5$ Hz), 5.56 (1H, s), 2.38 (2H, m), 2.19 (1H, m), 1.56 (3H, s), 1.39 (3H, s), 1.04 (3H, d), 1.03 (3H, d); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ_{C} 184.4, 175.3, 162.1, 159.7, 153.8, 143.0, 134.6, 115.0, 114.3, 113.0, 108.4, 82.5, 76.2, 43.2, 26.4, 25.9, 22.6, 19.6, 22.6。根据以上信号推测其为典型的 APs 类, 母核为 4'-oxo-lomatol。在 HMBC 谱中 (图 2), 观察到 δ_{H} 2.38 与 δ_{C} 22.6 (C-4'') 和 δ_{C} 22.6 (C-5'') 相关, 表明 3' 位的取代基为异戊酰氧基, 以上数据与文献^[16]报道 3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatol 基本一致。根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将 **2A** 和 **2B** 分别鉴定为 (3'*S*)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatol、(3'*R*)-3'-isovaleryl-4'-oxo-lomatol。

由于化合物 **1** 和 **2** 的结构差异仅表现为 5'' 位的甲基取代位置不同, 且母核的氢信号和碳信号也完全一致, 化学结构高度相似, 两个化合物在反相色谱柱, 反相手性色谱柱和正相手性色谱柱上, 均不能得到有效的分离 (图 3), 因此在本实验中二者未得到分离。

3 讨论

随着分析方法和仪器的快速发展, 通过导向性的分离策略 (活性导向、LC-MS 导向和 NMR 导向策略),

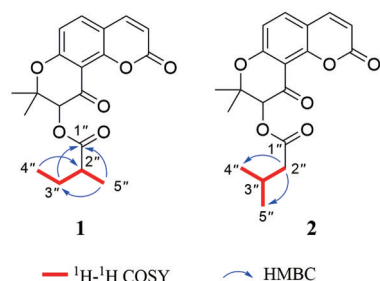


Figure 2 The key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compounds **1** and **2**

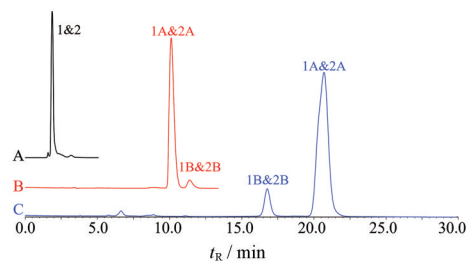


Figure 3 Chromatography spectra of compounds **1** and **2** in different separation conditions. A: Mobile phase ACN- $\text{H}_2\text{O} = 95:5$, CAPCELL CORE RP C18 column (150 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm), flow rate 0.2 mL \cdot min $^{-1}$; B: Mobile phase ACN- $\text{H}_2\text{O} = 50:50$, CHIRALPAK[®] AD-RH (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm), flow rate 0.5 mL \cdot min $^{-1}$; C: Mobile phase EtOH-Hexane = 50:50, CHIRALPAK[®] IC (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), flow rate 0.5 mL \cdot min $^{-1}$

不仅提高了新化合物和活性成分的发现效率, 而且增加了化合物识别和结构鉴定的准确性, 为中药及天然药物的化学成分研究提供了强有力的技术支持。本文利用 LC-MS 对前胡中的 APs 类化合物导向分离, 共分离得到 16 个 APs 类化合物, 包括 7 组对映体。其中, 化合物 **1A**、**1B** 为新化合物, 化合物 **2A** 为已知平面结构的新构型, 化合物 **2A**、**2B** 为首次从前胡中分离得到。本研究不仅丰富了前胡中 APs 类化学成分, 也为前胡药效物质的深入阐明和开发利用奠定了基础。

实验部分

岛津 IT-TOF-MS 系统、岛津 LC-20AD_{XR} 型分析型液相色谱仪和岛津 LC-20AT 型半制备型液相色谱仪 (日本岛津公司); Thermo-Fisher U3000 双三元分析型液相色谱仪 (美国 Thermo-Fisher 公司); Phenomenex Luna C18 (2) 半制备高效液相色谱柱 (250 mm \times 10 mm, 5 μm , 美国 Phenomenex 公司); CAPCELL CORE RPC18 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 2.7 μm , 日本资生堂公司); 反相手性色谱柱 CHIRALPAK[®] AD-RH (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 和正相手性色谱柱 CHIRALPAK[®] IC (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 日本大赛璐公司; XS105 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); 超声波清洗器 (南京垒君达公司); 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 硅胶 (200~300 目) 和 GF254 硅胶预制板 (青岛海洋化工厂); ODS C₁₈ (40~63 μm , 德国 Merck 公司); Sephadex LH-20 (瑞典 GE Healthcare Bio-Sciences 公司)。

提取分离所用无水乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等试剂均为分析纯 (西陇科学股份有限公司); 质谱级乙腈、色谱级乙醇和色谱级正己烷购于美国 Thermo-Fisher 公司; 水为实验室自制超纯水 (18.2 M Ω ·cm)。

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 *Peucedanum praeruptorum* Dunn 的干燥根,样品标本存放于北京中医药大学中药现代研究中心(标本号:2022-SYL-QH1)。

1 非手性和手性LC-MS分析

非手性LC-MS分析在岛津UHPLC-IT-TOF-MS系统上测定。CAPCELL CORE RPC₁₈色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 2.7 μm, 日本资生堂公司);流动相:0.1%甲酸水(A)-乙腈(B);洗脱程序:0~4.0 min, 50%~57% B; 4.0~10.0 min, 57%~67% B; 10.0~20.0 min, 67%~68% B; 20.0~25.0 min, 68%~95% B; 25.0~35.0 min, 95% B;柱温, 35 °C;流速, 0.2 mL·min⁻¹。电喷雾离子源(ESI)正、负离子模式,自动多级全扫描模式,MS¹质量扫描范围为 *m/z* 100~1 000, MS²质量扫描范围为 *m/z* 50~1 000, MS³质量扫描范围为 *m/z* 50~1 000。喷雾室电压分别为4.5 kV和-3.5 kV;雾化气(N₂)流量, 1.5 L·min⁻¹;干燥气体压力, 100 MPa;检测电压, 1.56 kV;曲型脱溶剂管(CDL)和加热模块温度: 200 °C;碰撞诱导解离(CID)能量, 70%。

非手性-手性LC-MS分析在U3000液相色谱串联IT-TOF-MS系统上测定,采用文献^[12]所述仪器连接方式及分析条件。

2 提取分离

前胡干燥饮片共5 kg,粉碎,用9倍量95%乙醇加热回流提取3次,每次1 h。提取液减压回收溶剂,依次使用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,浓缩萃取液得到石油醚部位(193.83 g)、二氯甲烷部位(11.00 g)、乙酸乙酯部位(7.78 g)及正丁醇部位(30.31 g)。

乙酸乙酯部位(7.78 g)利用硅胶柱色谱进行分离,用石油醚-乙酸乙酯(20:1→1:1)、二氯甲烷-甲醇(20:1→0:1)分别进行梯度洗脱,并通过TLC检视合并相同流分,最终得到11个流分(Frs. 1~11)。

Fr. 5 (78.00 mg)利用Sephadex LH-20柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(3:1)洗脱得到6个流分(Frs. 5A~5F),其中Fr. 5B (52.80 mg)经反相半制备液相色谱(乙腈-水 = 50:50, 3 mL·min⁻¹, 280 nm)纯化得到化合物**1** & **2** (共22.90 mg)和**3** (23.17 mg)。化合物**1**、**2**均通过反相手性柱色谱(乙腈-水 = 50:50, 0.5 mL·min⁻¹, 280 nm)分离得到**1A**、**2A** (共19.42 mg, *t_R* = 10.69 min)和**1B**、**2B** (共1.20 mg, *t_R* = 12.04 min),化合物**3**通过反相手性柱色谱(乙腈-水 = 50:50, 0.5 mL·min⁻¹, 280 nm)分离得到**3A** (20.00 mg, *t_R* = 10.30 min)和**3B** (1.22 mg, *t_R* = 12.24 min)。

Fr. 2 (544.13 mg)利用Sephadex LH-20柱色谱,二氯甲烷-甲醇(3:1)洗脱得到6个流分(Frs. 2A~2F),Fr. 2C (346.40 mg)通过ODS柱(甲醇-水 = 3:1)洗脱得到3个流分(Frs. 2C.1~2C.3),其中Fr. 2C.1 (133.35 mg)经反相半制备液相色谱(乙腈-水 = 60:40, 3 mL·min⁻¹, 280 nm)得到4个流分(Frs. 2C.1A~1D),流分Fr. 2C.1B为化合物**4** (23.18 mg),进一步通过正相手性柱色谱(无水乙醇-己烷 = 25:75, 0.5 mL·min⁻¹, 280 nm)分离得到化合物**4A** (16.00 mg, *t_R* = 14.02 min)和**4B** (5.00 mg, *t_R* = 11.25 min)。流分Fr. 2C.1C (94.00 mg)通过正相手性柱色谱(无水乙醇-己烷 = 25:75, 0.5 mL·min⁻¹, 280 nm)分离纯化得到**5A** (1.27 mg, *t_R* = 14.45 min)、**5B** (27.02 mg, *t_R* = 9.67 min)、**6** (7.07 mg, *t_R* = 19.92 min)和**7** (13.57 mg, *t_R* = 23.18 min)。

Fr. 3 (1.37 g)利用Sephadex LH-20柱色谱,以二氯甲烷-甲醇(3:1)洗脱得到7个流分(Frs. 3A~3G)。Fr. 3D (67.12 mg)经Sephadex LH-20柱色谱再次分离得到3个流分(Frs. 3D.1~3D.3),Fr. 3D.2 (45.36 mg)经半制备液相色谱(C₁₈, 乙腈-水 = 70:30, 3 mL·min⁻¹, 280 nm)纯化得到化合物**8** (35.50 mg)。进一步通过反相手性柱色谱(乙腈-水 = 50:50, 0.7 mL·min⁻¹, 280 nm)分离得到**8A** (30.00 mg, *t_R* = 6.47 min)和**8B** (2.18 mg, *t_R* = 8.35 min)。

Fr. 9 (136.10 mg)利用Sephadex LH-20柱色谱,二氯甲烷-甲醇(3:1)洗脱得到8个流分(Fr. 9A~9H),其中Fr. 9F (18.00 mg)经反相半制备液相色谱(乙腈-水 = 50:50, 3 mL·min⁻¹, 280 nm)得到化合物**9** (6.26 mg),通过正相手性柱色谱(无水乙醇-己烷 = 25:75, 0.5 mL·min⁻¹, 280 nm)分离纯化得到**9A** (1.08 mg, *t_R* = 12.43 min)和**9B** (4.11 mg, *t_R* = 15.28 min)。

3 结构鉴定

根据文献^[12-15,17]报道,前胡中APs类对映异构体中右旋体(*d*-APs)的含量大于左旋体(*l*-APs),并且在反相手性柱上,3'*S*构型比3'*R*构型先流出,即*t_R*(3'*S*-APs) < *t_R*(3'*R*-APs)。故将化合物**1A**、**2A**、**3A**、**4A**、**5A**、**8A**和**9A**鉴定为3'*S*-APs(*d*-APs),化合物**1B**、**2B**、**3B**、**4B**、**5B**、**8B**和**9B**鉴定为3'*R*-APs(*l*-APs)。此外,通过H-3'和H-4'的耦合常数和化学位移可以判断C-3'和C-4'为*cis*-或者*trans*-构型^[17]。

化合物**1**、**2** 白色粉末;ESI-MS *m/z* 367.115 0 [M+Na]⁺,分子式为C₁₉H₂₀O₆, (Calcd.: 367.115 2, -0.54 ppm)。¹H NMR(CDCl₃, 600 MHz)和¹³C NMR(CDCl₃, 150 MHz)数据见表1。

化合物**3** 白色粉末;ESI-MS *m/z* 365.098 8 [M+Na]⁺,分子式为C₁₉H₁₈O₆, (Calcd.: 365.099 6, -2.19 ppm)。

Table 1 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) data of compounds **1A/1B** and **2A/2B**

No.	1A/1B		2A/2B	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.7		159.7
3	6.31 (1H, d, $J=9.5$ Hz)	114.3	6.31 (1H, d, $J=9.5$ Hz)	114.3
4	7.61 (1H, d, $J=9.5$ Hz)	143.0	7.61 (1H, d, $J=9.5$ Hz)	143.0
5	7.55 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	134.6	7.55 (1H, d, $J=8.6$ Hz)	134.6
6	6.87 (1H, d, $J=8.7$ Hz)	115.0	6.87 (1H, d, $J=8.7$ Hz)	115.0
7		162.1		162.1
8		108.4		108.4
9		153.8		153.8
10		113.0		113.0
2'		82.5		82.5
3'	5.56 (1H, s)	76.2	5.56 (1H, s)	76.2
4'		184.4		184.4
5'	1.56 (3H, s)	26.4	1.56 (3H, s)	26.4
6'	1.39 (3H, s)	19.6	1.39 (3H, s)	19.6
1''		175.3		175.3
2''	2.56 (1H, m)	41.2	2.38 (2H, m)	43.2
3''	1.78 (1H, m)	26.8	2.19 (1H, m)	25.9
	1.56 (1H, m)			
4''	0.98 (3H, t, $J=7.4$ Hz)	11.8	1.04 (3H, d)	22.6
5''	1.27 (3H, d, $J=6.9$ Hz)	16.9	1.03 (3H, d)	22.6

^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ_{H} 7.91 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.80 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 6.99 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-6), 6.35 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 6.28 (1H, q, $J=7.4$ Hz, H-3''), 5.71 (1H, s, H-3'), 2.03 (3H, d, $J=7.2$ Hz, H-4''), 1.98 (3H, s, $J=1.4$ Hz, H-5''), 1.61 (3H, s, H-6'), 1.43 (3H, s, H-5'); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ_{C} 160.0 (C-2), 114.3 (C-3), 143.5 (C-4), 134.7 (C-5), 114.3 (C-6), 161.6 (C-7), 107.2 (C-8), 152.7 (C-9), 112.6 (C-10), 81.6 (C-2'), 76.0 (C-3'), 184.5 (C-4'), 18.9 (2'- CH_3), 24.7 (2'- CH_3), 166.4 (C-1''), 126.1 (C-2''), 139.2 (C-3''), 14.4 (4''- CH_3), 18.1 (5''- CH_3)。以上数据与文献^[18]报道基本一致, 根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将 **3A** 和 **3B** 分别鉴定为 (3'S)-3-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin 和 (3'R)-3'-angeloyloxy-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin。

化合物 **4** 白色粉末; ESI-MS m/z 449.156 7 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$, (Calcd.: 449.157 1, -0.89 ppm)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 7.59 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 6.81 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-6), 6.70 (1H, d, $J=4.9$ Hz, H-4'), 6.22 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 6.12 (1H, m, H-3''), 6.03 (1H, m, H-3'''), 5.45 (1H, d, $J=4.9$ Hz, H-3'), 1.97 (6H, m, H-5'', 5'''), 1.85 (3H, q, H-4''), 1.83 (3H, q, H-4'''), 1.49 (3H, s, H-6'), 1.45 (3H, s, H-5''); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ_{C} 159.9 (C-2), 113.4 (C-3), 143.3 (C-4), 129.3 (C-5), 114.5 (C-6), 156.8 (C-7), 107.7 (C-8), 154.2 (C-9), 112.6 (C-10), 77.6 (C-2'), 70.3 (C-3'), 60.3 (C-4'), 22.7 (2'- CH_3), 25.5 (2'- CH_3), 166.6

(C-1''), 127.5 (C-2''), 140.0 (C-3''), 20.6 (4''- CH_3), 15.9 (5''- CH_3), 166.4 (C-1'''), 127.1 (C-2'''), 138.6 (C-3'''), 20.5 (4'''- CH_3), 15.7 (5'''- CH_3)。以上数据与文献^[19]报道基本一致, 根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将 **4A** 和 **4B** 分别鉴定为 (3'S,4'S)-白花前胡乙素和 (3'R,4'R)-白花前胡乙素。

化合物 **5** 白色粉末; ESI-MS m/z 451.174 8 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$, (Calcd.: 451.172 7, 4.65 ppm)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 7.59 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-4), 7.35 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-5), 6.79 (1H, d, $J=8.6$ Hz, H-6), 6.61 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-4'), 6.22 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 6.12 (1H, m, $J=7.3, 1.5$ Hz, H-3''), 5.39 (1H, d, $J=4.8$ Hz, H-3'), 2.28 (1H, m, H-2'''), 2.18 (1H, m, H-2''), 2.12 (1H, m, H-3'''), 1.96 (3H, m, H-4''), 1.86 (3H, t, H-5''), 1.47 (3H, s, H-6'), 1.44 (3H, s, H-5'), 0.96 (3H, d, H-4'') 0.94 (3H, d, H-5''); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ_{C} 159.9 (C-2), 113.3 (C-3), 143.3 (C-4), 129.3 (C-5), 114.5 (C-6), 156.8 (C-7), 107.5 (C-8), 154.1 (C-9), 112.6 (C-10), 77.7 (C-2'), 70.2 (C-3'), 60.7 (C-4'), 22.8 (2'- CH_3), 25.3 (2'- CH_3), 166.5 (C-1''), 127.1 (C-2''), 139.8 (C-3''), 15.9 (4''- CH_3), 20.6 (5''- CH_3), 171.9 (C-1'''), 43.3 (C-2'''), 25.5 (C-3'''), 22.6 (4'''- CH_3), 22.6 (5'''- CH_3)。以上数据与文献^[19]报道基本一致, 根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将 **5A** 和 **5B** 分别鉴定为 (3'S,4'S)-白花前胡素 E 和 (3'R,4'R)-白花前胡素 E。

化合物 **6** 白色粉末; ESI-MS m/z 451.175 3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_7$, (Calcd.: 451.172 7, 5.76 ppm)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ_{H} 7.59 (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), 6.63 (1H, d, $J=4.9$ Hz, H-4'), 6.22 (1H, d, $J=9.5$ Hz, H-3), 6.03 (1H, m, H-3''), 5.37 (1H, d, $J=4.9$ Hz, H-3'), 2.22 (2H, dd, $J=7.1, 1.9$ Hz, H-2''), 2.10 (1H, m, H-3''), 1.99 (3H, dd, $J=7.2, 1.6$ Hz, H-4'''), 1.86 (3H, t, H-5''), 1.45 (3H, s, H-6'), 1.42 (3H, s, H-5'), 0.95 (6H, t, $J=6.5$ Hz, H-4'', H-5''); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ_{C} 159.9 (C-2), 113.4 (C-3), 143.3 (C-4), 129.4 (C-5), 114.5 (C-6), 156.8 (C-7), 107.5 (C-8), 154.2 (C-9), 112.6 (C-10), 77.5 (C-2'), 70.3 (C-3'), 60.3 (C-4'), 22.4 (2'- CH_3), 25.5 (2'- CH_3), 171.9 (C-1''), 43.2 (C-2''), 25.5 (C-3''), 22.5 (4''- CH_3), 22.6 (5''- CH_3), 166.9 (C-1'''), 127.6 (C-2'''), 138.0 (C-3'''), 15.7 (4'''- CH_3), 20.5 (5'''- CH_3)。以上数据与文献^[20]报道基本一致, 故鉴定化合物 **6** 为 3'-isovaleryl-4'-angeloyl-*cis*-khellactone。由于对映异构体未能成对出现, 用经验性规则难以鉴定该化合物空间结构。

化合物 **7** 白色粉末; ESI-MS m/z 451.175 0 [$\text{M}+$

Na]⁺, 分子式为C₂₄H₂₈O₇, (Calcd.: 451.172 7, 5.10 ppm)。¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ_H 7.53 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.29 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 6.73 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6), 6.54 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-4'), 6.15 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 6.05 (1H, m, H-3''), 5.33 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H-3'), 2.30 (1H, m, *J* = 6.9 Hz, H-2'''), 1.90 (3H, dd, H-4''), 1.80 (3H, s, H-5''), 1.65 (1H, m, H-3'''), 1.36 (1H, m, H-3'''), 1.41 (3H, s, H-6'), 1.37 (3H, s, H-5'), 1.12 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-5'''), 0.83 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-4'''); ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz): δ_C 159.8 (C-2), 113.3 (C-3), 143.3 (C-4), 129.3 (C-5), 114.5 (C-6), 156.8 (C-7), 107.6 (C-8), 154.1 (C-9), 112.6 (C-10), 77.6 (C-2'), 70.3 (C-3'), 60.6 (C-4'), 22.6 (2'-CH₃), 25.4 (2'-CH₃), 166.5 (C-1''), 127.1 (C-2''), 139.7 (C-3''), 15.9 (4''-CH₃), 20.6 (5''-CH₃), 175.3 (C-1'''), 41.3 (C-2'''), 26.5 (C-3'''), 11.7 (4'''-CH₃), 16.4 (5'''-CH₃)。以上数据与文献^[21]报道基本一致, 故鉴定化合物7为3'-angeloyl-4'-(2-methylbutyryl)-*cis*-khellactone。由于对映异构体未能成对出现, 用经验性规则难以鉴定该化合物空间结构。

化合物8 白色粉末; ESI-MS *m/z* 409.125 5 [M+Na]⁺, 分子式为C₂₁H₂₂O₇, (Calcd.: 409.125 8, -0.73 ppm)。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ_H 7.87 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.55 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5), 6.87 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 6.56 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-4'), 6.25 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 6.21 (1H, m, *J* = 7.3 Hz, H-3''), 5.40 (1H, d, *J* = 4.8 Hz, H-3'), 2.07 (3H, s, H-2'''), 1.95 (3H, m, H-4''), 1.86 (3H, m, H-5''), 1.48 (3H, s, H-6'), 1.44 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ_C 162.0 (C-2), 114.1 (C-3), 145.7 (C-4), 131.0 (C-5), 115.7 (C-6), 158.0 (C-7), 108.0 (C-8), 155.1 (C-9), 113.5 (C-10), 78.7 (C-2'), 71.4 (C-3'), 62.3 (C-4'), 22.9 (2'-CH₃), 25.3 (2'-CH₃), 167.7 (C-1''), 128.2 (C-2''), 140.9 (C-3''), 16.0 (4''-CH₃), 20.6 (5''-CH₃), 171.6 (C-1'''), 20.7 (2'''-CH₃)。以上数据与文献^[19]报道基本一致, 根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将8A和8B分别鉴定为(3'S,4'S)-白花前胡甲素和(3'R,4'R)-白花前胡甲素。

化合物9 黄绿色油状物; ESI-MS *m/z* 285.073 9 [M+Na]⁺, 分子式为C₁₄H₁₄O₅, (Calcd.: 285.073 3, 2.10 ppm)。¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz): δ_H 7.88 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-4), 7.46 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-5), 6.78 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6), 6.26 (1H, d, *J* = 9.5 Hz, H-3), 5.11 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H-4'), 3.77 (1H, d, *J* = 4.9 Hz, H-3'), 1.44 (3H, s, H-6'), 1.43 (3H, s, H-5'); ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz): δ_C 163.4 (C-2), 112.7 (C-3), 146.3 (C-4), 130.1 (C-5), 115.8 (C-6), 157.9 (C-7), 112.8 (C-

8), 155.8 (C-9), 113.7 (C-10), 80.2 (C-2'), 73.1 (C-3'), 62.1 (C-4'), 26.9 (2'-CH₃), 21.5 (2'-CH₃)。以上数据与文献^[22]报道基本一致, 根据手性色谱柱上的保留时间和峰面积, 将9A和9B分别鉴定为(3'S,4'S)-凯林内酯和(3'R,4'R)-凯林内酯。

作者贡献: 杨阳负责化合物分离纯化、文章撰写等工作; 龚兴成负责协助化合物分离工作、结构解析及稿件修改; 屠鹏飞负责实验指导和实验材料; 刘文静负责文章的审阅和提出论文写作的建议; 宋月林负责研究选题和研究方案设计。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

References

- [1] Xie XR, Zhang L, Li X, et al. Effect of Liangxue Jiedu Lishi Formula on serum lipidomics of imiquimod-induced *ApoE*^{-/-} mice based on LC-MS [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药)*, 2023, 34: 260-264.
- [2] Liu XC, Wu DS, Cao H, et al. Effect of Shaoyatong on fecal metabolites in rats with ulcerative colitis based on liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2023, 29: 61-70.
- [3] Sun L, Zhou Y, Yu Y, et al. Determination of aflatoxins B₁ in grain by LC-MS/MS [J]. *Food Ind (食品工业)*, 2023, 44: 125-129.
- [4] Fang Q, Zhao YY, Deng AP. Highly sensitive determination of diclofenac in water samples by LC-MS/MS [J]. *Chem Res Appl (化学研究与应用)*, 2018, 30: 1577-1580.
- [5] Ma XL, Li J, Zheng J, et al. LC-MS-guided isolation of insulin-secretion-promoting monoterpenoid carbazole alkaloids from *Murraya microphylla* [J]. *J Nat Prod*, 2018, 81: 2371-2380.
- [6] Pang DR, Li SS, Chen XN, et al. LC-MS guided isolation of two anti-inflammatory cyclic dihydrochalcane trimers from Chinese dragon's blood [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2019, 44: 2675-2679.
- [7] Wang WJ, Lu HQ, Sun LM, et al. Effects of praeurotin C on blood pressure and expression of phospholamban in spontaneously hypertensive rats [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21: 195-198.
- [8] Song ZQ, Li B, Tian KY, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Peucedani Radix* and *Peucedani Decursivi Radix* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 948-964.
- [9] Li ZK, Zhang FR, Wang SC, et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effects of praeurotin a in isolated rat thoracic aorta [J]. *Bioengineered*, 2022, 13: 10038-10046.
- [10] Jing WH, Song YL, Yan R, et al. Transport and metabolism of (±)-praeurotin A in Caco-2 cell monolayers [J]. *Xenobiotica*, 2011, 41: 71-81.
- [11] Song YL, Jing WH, Du G, et al. Qualitative analysis and enantio-specific determination of angular-type pyranocoumarins in

- Peucedani Radix using achiral and chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1338: 24-37.
- [12] Xu X, Li T, Cao LB, et al. Chemical profiling of Peucedani Radix by achiral-chiral liquid chromatography-predictive multiple reaction monitoring [J]. *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 2020, 48: 1717-1727.
- [13] Gong XC, Liu WJ, Cao Y, et al. Integrated strategy for widely targeted metabolome characterization of Peucedani Radix [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1678: 463360.
- [14] Liu Y, Song Q, Liu W, et al. Authentic compound-free strategy for simultaneous determination of primary coumarins in Peucedani Radix using offline high performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-tandem mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8: 645-654.
- [15] Song YL, Song QQ, Liu Y, et al. Integrated work-flow for quantitative metabolome profiling of plants, Peucedani Radix as a case [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 953: 40-47.
- [16] Onder A, Cinar AS, Baran M, et al. Coumarins from *Seseli petraeum* M. Bieb. (Apiaceae) and their α -glucosidase inhibitory activity [J]. *S Afr J Bot*, 2022, 144: 458-463.
- [17] Song YL, Jing WH, Tu PF, et al. Enantiomeric separation of angular-type pyranocoumarins from Peucedani Radix using AD-RH chiral column [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28: 545-550.
- [18] Zhang C, Xiao YQ, Li L, et al. Chemical constituents from roots of *Peucedanum praeruptorum* (V) [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2012, 37: 3573-3576.
- [19] Liu DP. Studies on the Chemical Constituents of *Peucedanum praeruptorum* Dunn (白花前胡的化学成分研究) [D]. Nanchang: Jiangxi University of Chinese Medicine, 2021.
- [20] Hong MJ, Kim J. Determination of the absolute configuration of khellactone esters from *Peucedanum japonicum* roots [J]. *J Nat Prod*, 2017, 80: 1354-1360.
- [21] Matsuda H, Murakami T, Nishida N, et al. Medicinal foodstuffs. XX. Vasorelaxant active constituents from the roots of *Angelica furcijuga* Kitagawa: structures of hyuganins A, B, C, and D [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2000, 48: 1429-1435.
- [22] Mira A, Alkhiary W, Zhu QC, et al. Improved biological activities of isoeopoxypteryxin by biotransformation [J]. *Chem Biodivers*, 2016, 13: 1307-1315.