

非手性-手性色谱-预测多反应监测法分析中药毛前胡的化学成分

许霞, 李婷, 贾金茹, 汤慧婷, 李军, 赵云芳*, 宋月林*

(北京中医药大学, 中药学院中药现代研究中心, 北京 100029)

摘要: 中药毛前胡为伞形科植物短片藁本 *Ligusticum brachylobum* Franch. 的干燥根, 主要用于治疗风热咳嗽痰多、痰热喘满、咯痰黄稠等证, 富含香豆素类化学成分, 含有多组对映异构体和非对映异构体。为了深入研究毛前胡的化学成分组成, 特别是对映异构体的组成, 研究建立了非手性-手性色谱-预测多反应监测法 (achiral-chiral-LC predictive MRM), 同步实现毛前胡化学成分的化学选择性和立体选择性分离, 以及高灵敏度定性分析。非手性色谱和手性液相色谱-串联质谱系统结合了 RP-C₁₈ 色谱柱的高效化学选择性分离能力以及手性色谱柱的立体选择性优势, 有效避免了中心切割非手性-手性二维液相色谱构造复杂、重现性难以满足定量要求等缺陷。采用小内径核壳型 RP-C₁₈ 色谱柱作为前端化学分离柱, 实现结构类似香豆素的高效化学选择性分离; 采用反相大内径 AD-RH 手性色谱柱, 实现对映异构体的手性拆分; 采用预测多反应监测模式, 实现化学成分的高灵敏度检出; 利用增强子离子扫描模式 (EPI) 采集各色谱峰的二级质谱信息, 鉴定化学结构。通过定量离子对、定性离子对及两者的比值, 判定是否为对映异构体。利用所构建的非手性-手性色谱耦联系统从毛前胡中共鉴定出 60 个化学成分, 其中 8 对香豆素对映异构体得到了良好分离。本研究为毛前胡以及含有对映异构体中药的深入定性、定量分析提供可靠的方法。

关键词: 非手性-手性色谱; 预测多反应监测; 对映异构体拆分; 角型吡喃香豆素; 毛前胡

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2021)06-0642-10

Analysis of chemical components of Chinese medicine *Ligustici Radix* by achiral-chiral liquid chromatography-predictive multiple reaction monitoring

XU Xia, LI Ting, JIA Jinru, TANG Huiting, LI Jun, ZHAO Yunfang*, SONG Yuelin*

(Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: *Ligustici Radix* (Chinese name: maoqianhu) consists of the dried roots of *Ligusticum brachylobum* Franch., which is mainly distributed in the Yunnan and Sichuan provinces. This herbal medicine has been primarily used for the treatment of cough in traditional Chinese medicine. *Ligustici Radix* is rich in coumarin derivatives. Interestingly, enantiomers and diastereomers are widely used for these coumarins, thus posing a great challenge for in-depth chemical profile characterization. In the present study, a new analytical platform, achiral-chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry (achiral-chiral LC-MS/MS) was configured to profile the chemical composition of *Ligustici Radix*. Because achiral and chiral columns were serially coupled, especially enantiomers, both chemically and enantiomerically selective separations could be accomplished simultaneously. The newly configured achiral-chiral LC-MS/MS platform did not require any electronic valve; hence, it could overcome the drawbacks of heart-

收稿日期: 2020-08-22

* 通讯联系人. Tel: (010) 64286100, E-mail: syltwe2005@163.com (宋月林); Tel: (010) 64286100, E-mail: yunfang.zhao@163.com (赵云芳).

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1707300); 国家自然科学基金项目 (81773875, 81973444).

Foundation item: National Key Research & Development Program of China (No. 2018YFC1707300); National Natural Science Foundation of China (Nos. 81773875, 81973444).

cutting achiral-chiral two-dimensional LC, i. e., sophisticated instrumentation and limited reproducibility due to the use of electronic valve(s) and the undesired retention time shift across different analytical runs. Some available candidates for chemically selective or enantio-merically selective separation were assayed; then, Capcell core RP-C₁₈ column that was packed with core-shell type particles, and AD-RH column embedding amylose coated particles were employed the achiral and the chiral columns, respectively. The narrow-bore core-shell RP-C₁₈ column served as the front tool to achieve efficient chemoselective separation of coumarin analogs, and enantioselective enantiomers were obtained by using a wide-bore AD-RH chiral column. The predictive multiple reaction monitoring (predictive MRM) mode allowed for the sensitive detection of potential components, and an enhanced product ion (EPI) scan, which was a unique function of Qtrap-MS, was programmed to record the MS² spectra for all captured signals and thus aid structural annotation. Online energy-resolved mass spectrometry (online ER-MS) was introduced to pursue the suitable collision energy for each compound; in particular, inferior collision energy instead of the optimal one was utilized to suppress the response of the primary components such as praeruptorin A, B and pteryxin. The criteria to judge enantiomers or not included identical quantitative and qualitative precursor-to-product ion transitions, identical quantitative versus qualitative responses, and longer retention times from achiral-chiral LC over single-column achiral LC. As a result, a total of sixty components were observed and structurally identified. In particular, enantiomerically selective separations were achieved for eight enantiomers, *cis*-khellactone (CKL), qianhucoumarin G (QC-G), pteryxin (Pte), praeruptorin A (PA), *cis*-3'-isovaleryl-4'-acetylkhellactone (IAK), praeruptorin B (PB), praeruptorin E (PE), and *cis*-3',4'-diisovalerylkhellactone (DIK). Notably, none of the enantiomers were present as racemates; instead, the proportion of one enantiomer in each pair was greater than the other. Achiral-chiral LC-predictive MRM is a feasible choice for the quantitative and qualitative analyses of Ligustici Radix as well as other herbal medicines characterized by enantiomers and diastereomers.

Key words: achiral-chiral liquid chromatography (achiral-chiral LC); predictive multiple reaction monitoring (predictive MRM); enantioseparation; angular-type pyranocoumarins (APs); Ligustici Radix

中药毛前胡(Ligustici Radix)为伞形科植物短片藁本(*Ligusticum brachylobum* Franch.)的干燥根,其性温,味甘、辛,入肝、脾、膀胱三经,主要用于治疗风热咳嗽痰多、痰热喘满、咯痰黄稠等证^[1]。毛前胡植物形状、功能主治与中药前胡(Peucedani Radix)均相似,常被用作前胡的替代品,但因其根茎部密布较为坚硬的残存叶鞘纤维,难以除净,故药材称为毛前胡。国内外对其化学成分研究较少,制

约了毛前胡的深度开发。因此,本研究对其化学成分进行深入阐明,以期为其进一步开发利用提供理论依据,同时也为其他伞形科中药中香豆素类成分分析提供借鉴。利用课题组前期^[2-4]建立的中心切割非手性-手性二维液相色谱-串联质谱系统(heart-cutting achiral-chiral 2D LC-MS/MS)以及直接进样-三维质谱法(DI-3D MS)对前胡和毛前胡的化学成分进行了系统的对比分析,通过比较各信号峰的

引用本文:许霞,李婷,贾金茹,汤慧婷,李军,赵云芳,宋月林. 非手性-手性色谱-预测多反应监测法分析中药毛前胡的化学成分. 色谱, 2021, 39(6): 642-651.

XU Xia, LI Ting, JIA Jinru, TANG Huiting, LI Jun, ZHAO Yunfang, SONG Yuelin. Analysis of chemical components of Chinese medicine Ligustici Radix by achiral-chiral liquid chromatography-predictive multiple reaction monitoring. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 39(6): 642-651.

多级质谱数据和保留时间,发现毛前胡的主要化学成分与前胡类似,均以顺式角型吡喃香豆素(即为顺式凯琳内酯衍生物)为主,且含有多组对映异构体。对前胡而言,多对对映异构体之间的含量差异性大,表现为对映异构体过量的现象^[5],并且对映异构体间往往呈现出药理活性^[6]和代谢^[7]差异。我们推测毛前胡中的这些对映异构体也并非以外消旋体的形式存在,而是其中一种构型含量较高,通常称为优映体。因此,在对中药毛前胡进行化学成分深入分析时,应对其对映异构体进行立体选择性分离,明确对映体之间的含量比例,从而更好地实现质量控制。

近年来,一些新兴的色谱填料技术例如核-壳颗粒^[8]、亚微米颗粒^[9,10]和整体柱^[11,12],使得 LC 的分离能力得到了显著提高,尤其是核-壳色谱柱因其具有更高的柱效、更低的反压以及更高的分析效率,为中药中结构类似物和非对映异构体的化学选择性分离提供了保障。手性色谱柱快速发展,多种涂敷型、键合型手性色谱填料^[13]的不断涌现使得绝大多数对映异构体都可以实现立体选择性分离。然而,手性色谱柱往往具有较差的化学选择性分离能力^[13],而 RP-C₁₈ 色谱柱虽然具有高效的化学选择性分离能力,但无法实现对映异构体的手性分离。

本研究将反相非手性色谱柱和手性色谱柱通过聚醚醚酮管线在线连接,该系统结合了 RP-C₁₈ 色谱柱的高效化学选择性分离能力和手性色谱柱的立体选择性优势,有效避免中心切割非手性-手性二维液相色谱-质谱联用系统的缺点,以期同步实现中药毛前胡化学成分的化学选择性和立体选择性分离。同时,充分利用类似中药(如前胡等)化学成分研究成果^[2],进而采用三重四极杆质谱特有的预测多反应监测(predictive MRM)模式^[14-16]实现化学成分的高灵敏度、高选择性分析。利用该系统从中药毛前胡中鉴定了其中 60 个化学成分,包括 4 个氨基酸类(AAs)、43 个角型吡喃香豆素类(APs)、10 个线型吡喃香豆素类(LFs)、2 个线型吡喃香豆素类(LPs)以及 1 个简单香豆素类(SC)化合物。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

U-3000 双三元色谱仪,配备两个三元泵(即左泵和右泵)、自动进样器、柱温箱和紫外检测器(美国 Thermo Fisher 公司);SCIEX 5500 Qtrap 质谱仪(美国 Sciex 公司);Milli-Q 超纯水净化系统(美

国 Millipore 公司);Mettler ME204 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);超声波清洗器(南京垒君达超声电子有限公司);Premixer Assy 混合器(日本 Shimadzu 公司)。

色谱级和质谱级甲醇、乙腈以及质谱级甲酸均购自美国 Thermo Fisher 公司;实验用水由 Milli-Q 纯水系统制备;其余试剂均为分析纯,由北京化工厂提供。中药毛前胡购于北京同仁堂,经北京大学屠鹏飞教授鉴定为伞形科植物短片藁本 *Ligusticum brachylobum* Franch. 的干燥根。标本存放于北京中医药大学中药学院中药现代研究中心。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

取干燥的毛前胡药材,粉碎机粉碎,过 20 目筛。精密称取 1.0 g 粉末样品,置具塞锥形瓶中,加入 70% (v/v) 甲醇水溶液 50.0 mL, 密塞,超声提取 30 min,放冷再次称重,用 70% (v/v) 甲醇水溶液补足失重,以 12 000 r/min 的转速离心 10 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液 500 μL,待测。

1.2.2 液相色谱条件

Achiral-chiral LC-MS/MS 系统各模块连接示意图如图 1 所示。使用聚醚醚酮管将非手性柱和手性柱在线连接,利用 Premixer Assy 混合器将非手性柱洗脱液与左泵流动相充分混合。非手性色谱柱:Capcell core RP-C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 2.7 μm, 日本 Shiseido 公司);手性色谱柱:AD-RH 色谱柱(150×4.6 mm, 5.0 μm, 日本 Daicel 公司)。右泵输送溶剂 A(0.1% (v/v) 甲酸水溶液)和溶剂 B(乙腈),梯度洗脱程序为:0~4.0 min, 10% B; 4.0~15.0 min, 10% B~25% B; 15.0~23.0 min, 25% B~50% B; 23.0~28.0 min, 50% B~57% B; 28.0~34.0 min, 57% B~67% B; 34.0~44.0 min, 67% B~68% B; 44.0~56.0 min, 68% B; 56.0~60.0 min, 68% B~95% B; 60.0~60.1 min, 95% B~10% B;

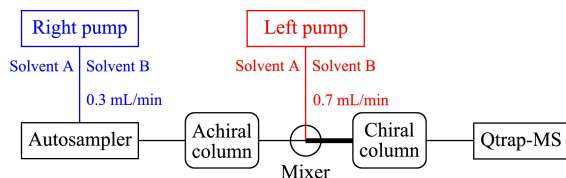


图 1 非手性-手性液相色谱-串联质谱系统构建示意图

Fig. 1 Connectivity sketch of achiral-chiral LC-MS/MS platform

Solvent A: 0.1% formic acid aqueous solution; solvent B: acetonitrile.

60.1~66.0 min, 10% B;总流速为0.3 mL/min。左泵输送溶剂 A 和溶剂 B,梯度洗脱程序为:0~4.0 min, 95% B~86% B; 4.0~15.0 min, 86% B~70% B; 15.0~23.0 min, 70% B~50% B; 23.0~28.0 min, 50% B~47% B; 28.0~34.0 min, 47% B~43% B; 34.0~44.0 min, 43% B~42% B; 44.0~56.0 min, 42% B; 56.0~60.0 min, 42% B~21% B; 60.0~60.1 min, 21% B~95% B; 60.1~66.0 min, 95% B;总流速为0.7 mL/min。进样体积为3 μ L,色谱柱均置于35 $^{\circ}$ C柱温箱中。

1.2.3 质谱条件

手性色谱柱洗脱液直接导入三重四极杆质谱进行分析。电喷雾电离(ESI)源,正离子模式,预测多反应监测模式检测各化学成分。电喷雾电压:5 500 V;离子化温度:550 $^{\circ}$ C;雾化气压力(GS1):379.2 kPa;辅助气压力(GS2):379.2 kPa;气帘气压力(CUR):241.3 kPa。Q1和Q3均为单位分辨率(0.6~0.8 Da)。预测离子对(Q1>Q3)及相关质谱参数(脱簇电压(DP)和碰撞能(CE))如表1所示,每个离子对的采集时间(dwel time)为10 ms。

由于对映异构体质谱行为完全一致,因此本研究对于每个化合物均采用两对离子对进行检测,并利用定量和定性离子对丰度比值(QQR)判定两个色谱信号是否为对映异构体^[23,24]。利用数据依赖性采集模式触发增强子离子扫描(EPI)模式记录各母离子的MS²图谱。EPI实验参数为:CE, 40 eV;碰撞能量分散(CES), 35 eV。利用Analyst 1.6.2软件对数据进行分析。

2 结果与讨论

2.1 液相条件的优化

课题组前期在建立反相色谱和亲水作用色谱直接耦联系统^[25,26]时发现,通过选择内径小、柱效高的反相色谱柱作为前端色谱柱可以达到较好的分离效果。本实验筛选并考察了多个候选色谱柱,如ACE UltraCore 2.5 Super C₁₈(150 mm \times 2.1 mm, 2.5 μ m,英国Advance Chromatography Technologies公司)、Waters Acquity UPLC HSS T3(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m,美国Waters公司)、Ascen-tis[®] Express F5(150 mm \times 3.0 mm, 2.7 μ m,美国Sigma-Aldrich公司)、Capcell core RP-C₁₈(150 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m,日本Shiseido公司)等多款核壳型或新型填料高效色谱柱,以色谱峰形、分离度

作为指标衡量色谱柱的分离效能,最终选择Capcell core RP-C₁₈色谱柱作为前端化学选择性分离柱。

进一步优化非手性柱流动相流速(0.15、0.20、0.30和0.35 mL/min)和手性柱流动相流速(0.60、0.70和0.80 mL/min)、流动相的洗脱程序以及在水中加入甲酸的体积分数(0%、0.05%、0.10%和0.15%)。最终选定0.1%甲酸作为水相的添加剂;非手性柱和手性柱的流速分别为0.3 mL/min和0.7 mL/min;具体洗脱程序见1.2.2节。

前期研究表明,AD-RH色谱柱^[3,7,27]对APs对映异构体有较好的分离效果,其反相分离机制与前端色谱柱能够很好地兼容。在APs中,C-3'和C-4'取代基团的大小会影响对映异构体的分离效能,且取代基团越大,分离效果越差,需要采用较低比例的有机相和较长的洗脱时间才能达到较好的分离。因此,在洗脱过程中逐步降低流动相的比例,且在RP-C₁₈和AD-RH色谱柱之间引入稀释泵,可以对含有大取代基团的对映异构体实现良好的色谱分离。对映异构体在AD-RH手性色谱柱上的流出顺序决定于手性中心与表面涂敷有直链淀粉-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)的硅胶之间的作用力^[28]。课题组前期研究^[3]发现,(3'S,4'S)构型的对映异构体与固定相的作用力小于其(3'R,4'R)对映异构体,其被率先洗脱出来。因此,毛前胡中具有较小保留时间的对映异构体构型被认为是(3'S,4'S)构型,为了表述方便,以下简称3'S构型。

2.2 多反应监测模式的条件优化

结合已经报道^[29]的质谱裂解规律及MRM离子对信息,笔者首先对预测离子对的化学结构进行验证,进而采用预测多反应监测模式检测各化学成分,并利用EPI模式获取化合物的二级质谱信息,结合碎片离子对化合物进行鉴定。前期研究^[2]表明,毛前胡中所含的化学成分与前胡相似,不同成分的含量差异大,其中含量较高的APs可能会影响微量化合物的检出。因此,本实验引入在线能量分辨质谱法^[30,31]对各化合物的碰撞能进行优化,采用非最优碰撞能抑制高含量成分的质谱响应,从而实现所有化合物的检出。

2.3 对映异构体判别

实验通过QQR判定是否为对映异构体^[23,24],结合对映异构体在achiral-chiral LC系统上的保留时间大于在单柱RP-C₁₈色谱柱上的保留时间,经过验证,发现顺式-凯琳内酯(CKL,7和8(表1中化

表 1 中药毛前胡化学成分在非手性-手性色谱-预测多反应监测系统上的质谱信息
Table 1 MS information of components in Chinese medicine Ligustici Radix using achiral-chiral LC-predictive MRM

No.	t_R / min	Molecular formula	Fragment ions (m/z)	Precursor Product		Putative identity	DP/ V	CE/ eV	Chemical class	Ref.
				ion (m/z)	ion (m/z)					
1	2.92	C ₅ H ₉ NO ₄	129.60; 106.32; 84.04	148.06	84.04	glutamic acid	25	23	AA	[4]
2	3.00	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	152.06	284.09	152.06	guanosine	50	25	AA	[4]
3	3.15	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113.08; 86.08	132.10	86.08	isoleucine	50	18	AA	[4]
4	3.25	C ₆ H ₁₃ NO ₂	113.08; 86.08	132.10	86.08	leucine	40	30	AA	[4]
5	5.09	C ₁₅ H ₁₆ O ₈	163.04; 53.78	325.09	163.04	skimmin	80	25	SC	[3,4]
6	12.61	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	245.08; 227.07; 191.03	263.09	245.08	<i>trans</i> -khellactone (TKL)	80	24	AP	[3]
7	13.89	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	245.08; 191.04*	263.09	245.08	(3'S)- <i>cis</i> -khellactone (D-CKL)	80	27	AP	[3]
8	14.16	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	245.08; 191.04*	263.09	245.08	(3'R)- <i>cis</i> -khellactone (L-CKL)	80	27	AP	[3]
9	15.84	C ₂₀ H ₂₄ O ₉	247.09; 229.08; 175.04	409.15	247.09	nodakenin	80	23	LF	[17,18]
10	19.50	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	245.16* ; 227.04; 203.06; 175.04	263.09	203.06	(D/L)-qianhuocoumarin G (QC-G)	80	20	LF	[3,4]
11	19.70	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	245.16* ; 227.04; 203.06; 175.04	263.09	203.06	(D/L)-qianhuocoumarin G	80	20	LF	[3,4]
12	22.31	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	189.03	264.08	189.03	isopimpinellin	80	25	LF	[19]
13	23.91	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	361.13; 245.08	438.17	245.08	3'-(hydroxyl-isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-hydroxyl-acetylkhellactone	80	30	AP	[3]
14	24.20	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	361.14; 245.08; 187.03	438.17	245.08	3'-(hydroxyl-isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-hydroxyl-acetylkhellactone	80	30	AP	[3]
15	24.22	C ₁₆ H ₁₆ O ₆	287.10; 245.08	305.10	245.08	qianhuocoumarin B	80	30	AP	[4,20]
16	24.86	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	361.14; 245.08; 187.03	438.17	245.08	3'-(hydroxyl-isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-hydroxyl-acetylkhellactone	80	30	AP	[4]
17	25.73	C ₁₂ H ₈ O ₄	202.03; 174.06	217.04	202.03	bergapten or methoxsalen	80	20	LF	[21]
18	27.17	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	343.12; 245.08	420.16	343.12	3'-(hydroxyl-tigloyl/seneciroyl/angeloyl)-4'-acetylkhellactone	80	15	AP	[3]
19	27.57	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	343.11; 287.09; 245.08	420.16	343.11	3'-(hydroxyl-tigloyl/angeloyl/seneciroyl)-4'-acetylkhellactone	80	15	AP	[3]
20	29.29	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	245.08; 217.08; 175.04	287.09	245.08	3'-acetyloxy-3',4'-dihydroseselin or 4'-acetyloxy-3',4'-dihydroseselin	80	35	AP	[3,4]
21	29.31	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	287.09; 245.08; 227.07	369.09	245.08	qianhuocoumarin D	80	32	AP	[4]
22	29.85	C ₁₂ H ₈ O ₄	202.03; 174.06; 165.72	217.04	202.03	bergapten or methoxsalen	80	20	LF	[21]
23	30.70	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	329.14; 315.12; 245.08; 227.08	420.20	343.12	3'-(hydroxyl-tigloyl/angeloyl/seneciroyl)-4'-acetylkhellactone	80	15	AP	[4]
24	31.00	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	329.14; 315.12; 245.08; 227.07	420.20	343.12	3'-(hydroxyl-tigloyl/angeloyl/seneciroyl)-4'-acetylkhellactone	80	15	AP	[4]
25	31.40	C ₂₂ H ₂₆ O ₇	329.14; 315.12; 245.08; 227.07	420.20	329.14	3'-(isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-propionylkhellactone	80	30	AP	[3]
26	32.15	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	287.09; 245.08	378.15	245.08	3'-acetyl-4'-propionylkhellactone	80	30	AP	[3]
27	32.34	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	287.09; 245.08	378.15	245.08	3'-acetyl-4'-propionylkhellactone isomer	80	30	AP	[3]
28	33.52	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	245.08; 217.07; 205.04; 191.04	345.13	245.08	Pd-C-I	80	30	LP	[17]
29	35.18	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	287.09; 245.08	392.17	245.08	bocconin	80	15	AP	[3,4]
30	35.61	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	345.13; 245.08; 261.05	362.15	261.05	3'-(isovaleryloxy/2-methylbutyroyloxy)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin	80	30	AP	[3]
31	35.64	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	287.09; 245.08	392.17	245.08	isobocconin	80	15	AP	[4]
32	36.19	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	345.13; 261.06; 245.08	362.15	261.06	3'-(isovaleryloxy/2-methylbutyroyloxy)-4'-oxo-3',4'-dihydroseselin	80	30	AP	[3]
33	36.27	C ₁₁ H ₆ O ₄	175.04; 147.05	203.03	147.05	xanthotoxol	80	40	LF	[19]
34	36.45	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	203.03; 175.04; 159.03; 147.04; 131.02	271.09	203.03	imperatorin	80	18	LF	[3,19]
35	37.69	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	327.12; 287.09; 245.08; 227.07*	409.12	245.08	(3'S)-pteryxin (D-Pte)	80	20	AP	[3,4]

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	t_R / min	Molecular formula	Fragment ions (m/z)	Precursor Product		Putative identity	DP/ CE/ Chemical			Ref.
				ion (m/z)	ion (m/z)		V	eV	class	
36	37.71	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	245.08; 217.09; 175.04	287.09	245.08	4'-acetyl-khellactone	80	32	AP	[3,22]
37	38.04	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	327.12; 287.09; 245.08* ; 227.07	409.12	227.07	(3'S)-praeruptorin A (D-PA)	80	19	AP	[3,22]
38	38.12	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	349.10; 327.12; 251.06; 245.08; 227.07	451.17	245.08	3'-(isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-(tigloyl/ seneciroyl/angeloyl)-khellactone	80	34	AP	[4]
39	38.50	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	283.08; 233.04; 218.05; 189.12; 173.03	301.10	233.04	cnidilin	80	37	LF	[4]
40	38.94	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	245.08; 175.04	287.09	245.08	3'-acetyl-4'-dehydro-decusinol	80	32	LP	-
41	39.01	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	351.12; 245.08; 227.07	434.21	245.08	3'-(2-isobutyroyl)-4'-(isovaleryl/2-meth- ylbutyroyl)-khellactone	80	30	AP	[4]
42	39.03	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	329.13* ; 287.09; 245.08	406.18	245.08	(3'S)-3'-isovaleryl-4'-acetylkhellactone (D-IAK)	80	30	AP	[3]
43	39.49	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	327.12; 287.09; 245.07; 227.07*	409.12	245.08	(3'R)-pteryxin (L-Pte)	80	20	AP	[3,4]
44	39.58	C ₂₁ H ₂₂ O ₇	327.12; 287.09; 245.08* ; 227.07	409.12	227.07	(3'R)-praeruptorin A (L-PA)	80	19	AP	[3]
45	41.42	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	203.05; 175.04; 159.03; 147.03; 131.02	271.06	203.05	isoimperatorin	80	18	LF	[3,19]
46	41.60	C ₂₁ H ₂₄ O ₇	329.13* ; 287.09; 245.08	406.18	245.08	(3'R)-3'-isovaleryl-4'-acetylkhellactone (L-IAK)	80	30	AP	[3]
47	45.84	C ₂₃ H ₂₆ O ₇	315.12; 245.08	432.20	315.12	3'-(2-isobutyroyl)-4'-(tigloyl/seneciroyl/ angeloyl)-khellactone	80	15	AP	[3,4]
48	46.05	C ₂₃ H ₂₆ O ₇	327.13; 315.12; 227.09	432.20	227.09	3'-(2-isobutyroyl)-4'-(tigloyl/seneciroyl/ angeloyl)-khellactone	80	30	AP	[3,4]
49	47.41	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	327.12; 227.07	444.20	327.12	3'-(tigloyl/seneciroyl/angeloyl)-4'-(tigloyl/ seneciroyl/angeloyl)-khellactone	80	25	AP	[3,4]
50	48.16	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	327.12; 245.08; 217.08; 189.02	444.20	327.12	3'-(tigloyl/seneciroyl/angeloyl)-4'-(tigloyl/ seneciroyl/angeloyl)-khellactone	80	26	AP	[3,4]
51	48.90	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	351.13; 245.08; 227.07	434.21	245.08	3'-(2-isobutyroyl)-4'-(isovaleryl/2-meth- ylbutyroyl)-khellactone	80	30	AP	[3]
52	49.65	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	349.11; 327.12; 245.08* ; 227.06	444.20	327.12	(3'S)-praeruptorin B (D-PB)	80	36	AP	[3,4,22]
53	50.28	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	329.14; 327.12; 227.06;	451.17	245.08	3'-(isovaleryl/2-methylbutyroyl)-4'-(tigloyl/ seneciroyl/angeloyl)-khellactone	80	34	AP	[3,4]
54	50.50	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	349.11; 327.12; 245.08* ; 227.06	444.20	327.12	(3'R)-praeruptorin B (L-PB)	80	36	AP	[3,4,22]
55	51.61	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	349.11; 327.11; 251.06; 245.08; 227.07*	451.17	245.08	(3'S)-praeruptorin E (D-PE)	80	35	AP	[3,4]
56	54.31	C ₂₄ H ₂₈ O ₇	349.11; 327.11; 251.06; 245.08; 227.07*	451.17	245.08	(3'R)-praeruptorin E (L-PE)	80	35	AP	[3,4]
57	55.08	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	329.13; 245.08* ; 227.06	448.23	227.06	(3'S)-3',4'-diisovalerylkhellactone (D-DIK)	80	55	AP	[3,4]
58	56.49	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	329.13; 245.08* ; 227.06	448.23	227.06	(3'R)-3',4'-diisovalerylkhellactone (L-DIK)	80	55	AP	[3,4]
59	63.18	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	329.13; 245.08; 227.06	448.23	227.06	3',4'-diisovalerylkhellactone isomer	80	55	AP	
60	64.75	C ₂₄ H ₂₆ O ₇	327.12; 245.08; 217.08; 189.02	444.20	327.12	3'-(tigloyl/seneciroyl/angeloyl)-4'-(tigloyl/ seneciroyl/angeloyl)-khellactone	80	36	AP	[3,4]

DP: declustering potential; CE: collision energy; * quantifier ion; Pd-C-I: peucedanum decursivum coumarin I; AA: amino acid; SC: simple coumarin; AP: angular-type pyranocoumarin; LF: linear-type furocoumarin; LP: linear-type pyranocoumarin; -: new compound.

化合物的顺序编号))、前胡香豆素 G (QC-G, 10 和 11)、顺式-北美芹素 (Pte, 35 和 43)、白花前胡甲素 (PA, 37 和 44)、顺式-3'-异戊酰-4'-乙酰凯琳内酯 (IAK, 42 和 46)、白花前胡乙素 (PB, 52 和 54)、白花前胡素 E (PE, 55 和 56) 和顺式-3',4'-双异戊酰凯琳内酯 (DIK, 57 和 58) 共计 8 对对映异构体, 所有对映异构体在非手性-手性色谱耦联系统上均能较好地手性分离 (见图 2), 除前胡香豆素 G 为 LFs 外, 其余均为 APs。如化合物顺式-北美芹素 (35 和 43) 为 CKL 的衍生物, 在角型吡喃香豆素母核的 C-3'

和 C-4' 分别为乙酰基和当归酰基取代, 分子式为 $C_{21}H_{22}O_7$, 预测离子对包括 m/z 409.12 > 327.12、409.12 > 287.09、409.12 > 245.07、409.12 > 227.07, 利用数据依赖性采集模式触发 EPI, 获取母离子的二级质谱信息, 验证化合物的结构。选择 m/z 409.12 > 227.07 和 409.12 > 245.07 作为定量离子对和定性离子对, 化合物 L-Pte 和 D-Pte 的 QQR 均为 2.36, 根据两者的保留时间, 鉴定 L-Pte 和 D-Pte 分别为 3'S 和 3'R 构型。化合物顺式-北美芹素的叠加选择离子流图和二级质谱图如图 3a 和 3b 所示。

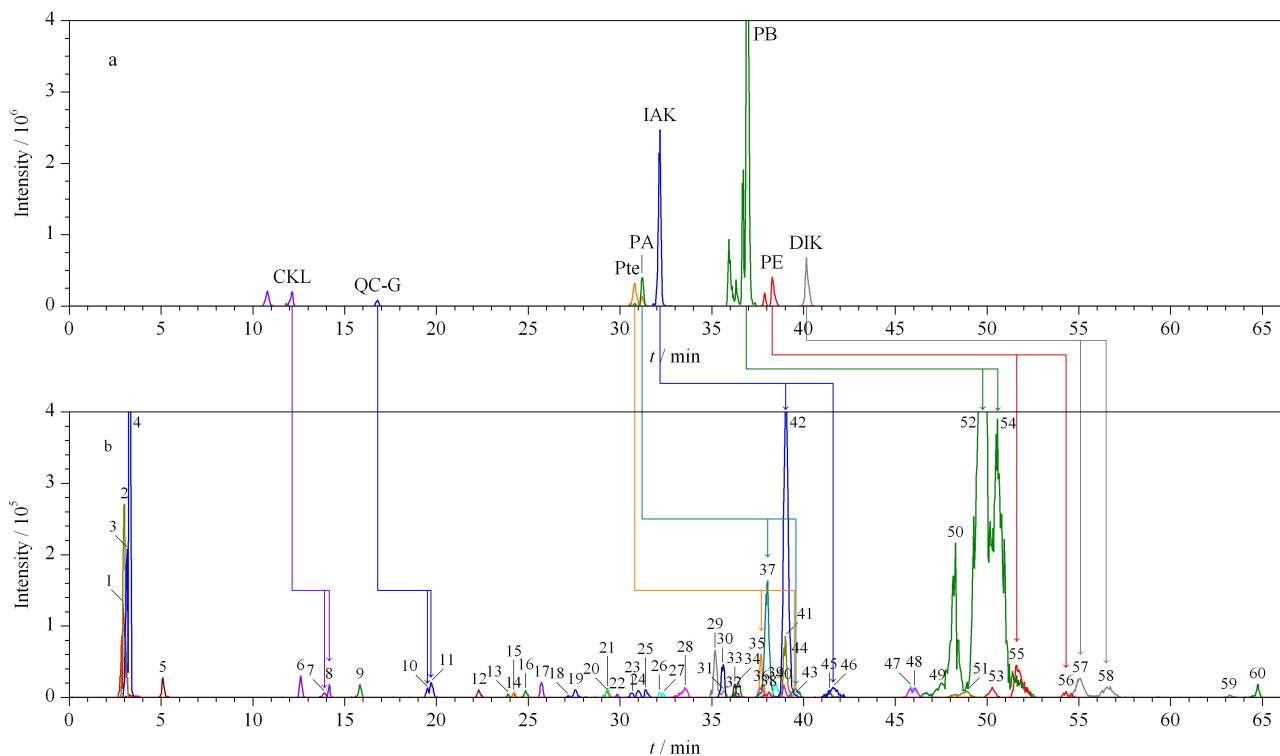


图 2 采用 (a) 非手性色谱-串联质谱和 (b) 非手性-手性色谱-串联质谱时毛前胡的选择离子流色谱图
Fig. 2 Extracted ion current chromatograms of Ligustici Radix using (a) achiral LC-MS/MS and (b) achiral-chiral LC-MS/MS

Peaks 1-60 are the same as that in Table 1.

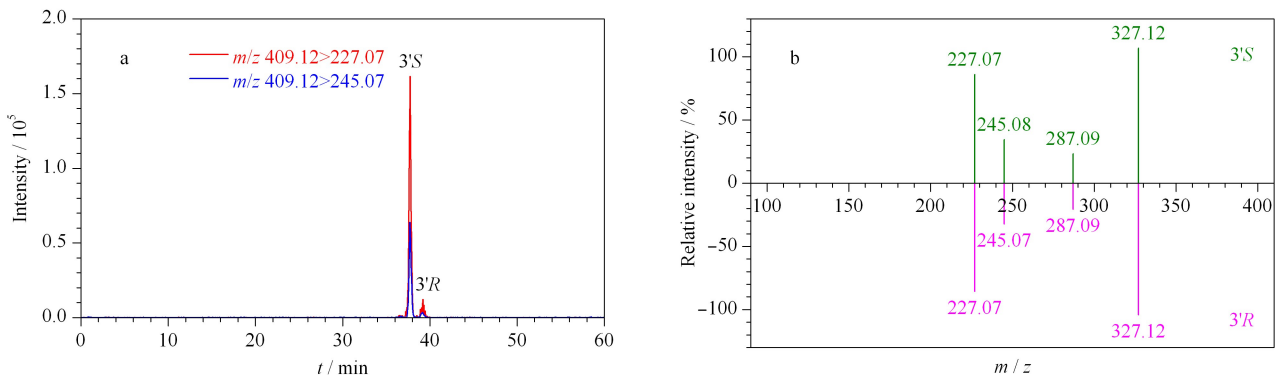


图 3 顺式-北美芹素的 (a) 叠加选择离子流色谱图和 (b) 二级质谱图
Fig. 3 (a) Overlaid extracted ion current chromatograms and (b) MS^2 spectrum of pteryxin

2.4 毛前胡结构鉴定及质谱裂解规律

2.4.1 化学成分定性分析

利用建立的非手性-手性色谱-预测多反应监测系统采集毛前胡在正离子模式下的质谱信息,结合碎片离子信息、文献对比、数据库搜索以及质谱裂解规律推导,对所有响应值大于 1 000 cps,且信噪比 (S/N) 大于 100 的信号进行结构确认,初步鉴定了其中 60 个化学成分,包括 4 个 AAs、43 个 APs、10 个 LFs、2 个 LPs 以及 1 个 SC 化合物。各化合物的保留时间、主要碎片离子、预测离子对以及可能的化学成分见表 1。

在正离子模式下,香豆素类化合物易产生准分子离子峰 $[M+H]^+$ 或加合离子峰 $[M+Na]^+$ 及 $[M+NH_4]^+$ 。APs 主要为顺式凯琳内酯的衍生物,大部分 APs 通过 C-3' 和 C-4' 的羟基结合不同的取代基形成不同的化合物,常见的取代基有乙酰基、当归酰基、巴豆酰基、千里光酰基、正丁酰基、异戊酰基等。对于 LFs 来说,主要通过 C-5 和 C-8 或 C-3' 和 C-4' 上取代基的不同,形成不同的化合物,如异戊烷氧基、甲氧基、糖基等。以下对毛前胡中的主要化学类

型的质谱裂解规律以及各化学成分的鉴定过程进行分述。

2.4.2 角型吡喃香豆素类

从毛前胡提取物中共鉴定出 43 个 APs 成分,大部分为顺式凯琳内酯的衍生物。对于 APs 来说,C-4' 取代基处于香豆素母核的苜位,可与香豆素母核形成大的共轭体系,得到更稳定的子离子。通过丢失 C-3' 和 C-4' 位的取代基,形成 m/z 245.07 特征性碎片离子,并进一步通过中性丢失水分子形成另一个 m/z 227.07 特征性碎片离子。例如,PA 在 C-3' 和 C-4' 位置分别有一个当归酰基和乙酰氧基取代,分子式为 $C_{21}H_{22}O_7$,最显著的准分子离子峰为 m/z 409.12 $[M+Na]^+$ 。化合物裂解时,首先从 C-4' 中性丢失一分子乙酰氧基 (60 Da),形成丰度最高的碎片离子 m/z 327.12 $[M+H-CH_3COONa]^+$ 、进而丢失 C-3' 取代基 (C_4H_6CO , 82 Da),形成特征碎片离子 m/z 245.08 $[M+H-CH_3COOH-C_4H_6-CO]^+$,随后进一步中性丢失一分子水,最终形成 m/z 227.07 $[M+H-CH_3COOH-C_4H_7COOH]^+$ 的特征碎片离子。PA 的质谱图和可能的裂解途径如图 4 所示。

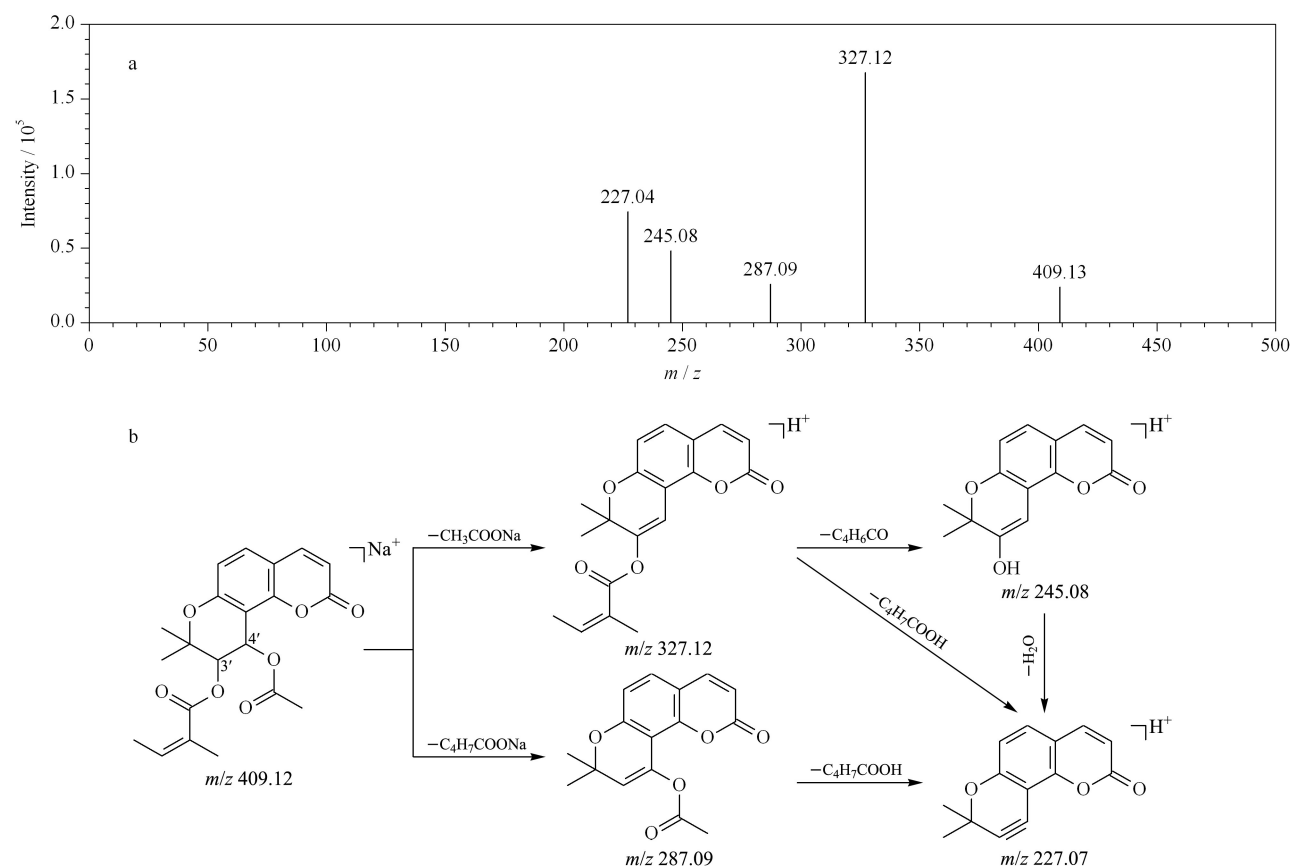


图 4 白花前胡甲素的 (a) 质谱图和 (b) 可能的裂解途径

Fig. 4 (a) MS spectrum and (b) proposed fragmentation pathways of PA

2.4.3 线型呋喃香豆素类

除 APs 外,毛前胡中还含有少量的 LFs 化学成分,其中包括一对对映异构体 QC-G (10 和 11)。质谱裂解规律主要由 C-5、C-8 或 C-3'、C-4' 取代基的不同而产生,常见的取代基有异戊烷氧基、甲氧基、羟基、糖基等。

C-5 或 C-8 取代基首先通过中性丢失形成 m/z 203.05 碎片离子,随后进一步中性丢失 CO (28 Da) 和 CO_2 (44 Da),分别产生 m/z 175.04 和 159.03 的

特征性碎片离子^[21]。C-3' 或 C-4' 取代的化合物,通过中性丢失 C-3' 或 C-4' 上的取代基,形成 m/z 247.08 和 229.20 的特征性碎片离子^[19]。如紫花前胡苷,准分子离子峰 m/z 409.08 $[\text{M}+\text{H}]^+$,分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_9$, C-3' 有葡萄糖基取代,中性丢失一分子葡萄糖残基,产生 m/z 247.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ 的碎片离子,随后,进一步丢失一分子水,形成 m/z 229.20 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}]^+$ 的特征性离子。紫花前胡苷质谱图和可能的裂解途径如图 5 所示。

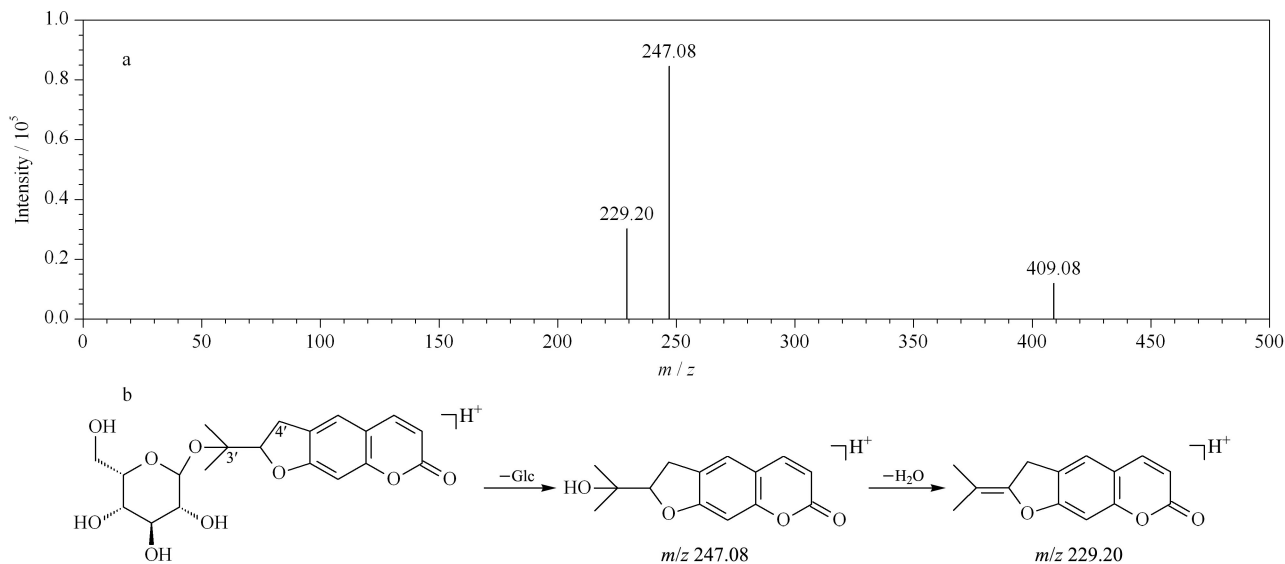


图 5 紫花前胡苷的 (a) 质谱图和 (b) 可能的裂解途径

Fig. 5 (a) MS spectrum and (b) proposed fragmentation pathways of nodakenin

2.5 非手性-手性色谱-预测多反应监测法优缺点

非手性-手性色谱耦联系统结合了 RP-C₁₈ 的高效分离能力以及手性色谱柱的立体选择性优势,可以同步实现化合物的化学选择性和立体选择性分离。相比较于中心切割非手性-手性二维液相色谱而言,非手性-手性色谱耦联系统具有仪器配置简单、重复性好、精密度高的优点。然而,该系统也存在一定的缺点,如分离机制复杂,因为每个化合物都要经历 2 个色谱柱;寻找最佳的洗脱条件是一个具有挑战性的任务,因为输送溶剂最少需要 4 个泵;二维色谱柱的要求高,要兼顾一维色谱柱的洗脱能力等。

3 结论

中药中广泛存在对映异构体,这些对映异构体往往具有不同的生物活性,从而发挥不同的治疗效果。全面阐明中药的化学成分组成,深入揭示对映异构体的含量差别将会使药物更好地发挥药理活

性。本研究建立了非手性-手性色谱-预测多反应监测法,实现了中药毛前胡的化学成分解析,揭示了其对映异构体的含量差异。本研究将为含有对映异构体的中药及其他复杂样品的深入定性、定量分析提供可靠的方法。

参考文献:

- [1] Sichuan Food and Drug Administration. Sichuan Standard for Chinese Materia Medica. Chengdu: Sichuan Scientific & Technical Publishers, 2011: 119
四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准. 成都: 四川科学技术出版社, 2011: 119
- [2] Xu X, Li W, Li T, et al. Anal Chem, 2020, 92(11): 7646
- [3] Song Y L, Jing W H, Du G, et al. J Chromatogr A, 2014, 1338: 24
- [4] Song Y L, Song Q Q, Liu Y, et al. Anal Chim Acta, 2017: 40
- [5] Chen Z X, Huang B S, She Q L, et al. Acta Pharmaceutica Sinica, 1979, 14(8): 486
陈政雄, 黄宝山, 余其龙, 等. 药学报, 1979, 14(8): 486
- [6] Xu Z, Wang X B, Dai Y, et al. Chem Biol Interact, 2010, 186(2): 239

- [7] Song Y L, Jing W H, Yang F Q, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88: 269
- [8] Zeng K W, Jiang Y, Wang J, et al. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(5): 849
曾克武, 姜勇, 王晶, 等. *中国中药杂志*, 2019, 44(5): 849
- [9] Hayes R, Ahmed A, Edge T, et al. *J Chromatogr A*, 2014: 36
- [10] Tanaka N, McCalley D V. *Anal Chem*, 2016, 88(1): 279
- [11] Svec F, Lv Y Q. *Anal Chem*, 2015, 87(1): 250
- [12] Hong T T, Yang X, Xu Y J, et al. *Anal Chim Acta*, 2016: 1
- [13] Chankvetadze B. *J Chromatogr A*, 2012, 1269: 26
- [14] Cao Y, Li T, Xu X, et al. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(13): 2667
曹妍, 李婷, 许霞, 等. *中国中药杂志*, 2019, 44(13): 2667
- [15] Zhang N, Li J, Song Q Q, et al. *Anal Methods*, 2016, 8(8): 1942
- [16] Yao C L, Pan H Q, Wang H, et al. *J Chromatogr A*, 2018, 1538: 34
- [17] Tao Y Y, Luo J G, Lu Y Y, et al. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(8): 1079
- [18] Liu H, Liu Y Z, Yu M L. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 35(1): 82
刘航, 刘雨竺, 余敏灵. *华西药学杂志*, 2020, 35(1): 82
- [19] Li B, Zhang X, Wang J, et al. *Phytochem Anal*, 2014, 25(3): 229
- [20] Kong L Y, Pei Y H, Li X, et al. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1993(10): 772
孔令义, 裴月湖, 李铎, 等. *药学报*, 1993(10): 772
- [21] Chang Y X, Zhang Q H, Li J, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 77: 71
- [22] Song Y L, Jing W H, Chen Y G, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 93: 86
- [23] Sun J, Huo H X, Song Y L, et al. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 252
- [24] Song Q Q, Liu W J, Chen X J, et al. *Anal Chim Acta*, 2018, 1037: 119
- [25] Yan Y, Song Q Q, Chen X J, et al. *J Chromatogr A*, 2017, 1501: 39
- [26] Liu W J, Song Q Q, Cao Y, et al. *Anal Chim Acta*, 2019, 1069: 89
- [27] Song Y L, Zhang Q W, Li Y P, et al. *Molecules*, 2012, 17(4): 4236
- [28] Zhai Z D, Shi Y P, Wu X M, et al. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(4): 939
- [29] Lee J Y, Lee S Y, Lee K, et al. *Chem Biol Interact*, 2015, 229: 109
- [30] Cao Y, Chai C C, Chang A Q, et al. *J Chromatogr A*, 2020, 1609: 460515
- [31] Song Q Q, Li J, Huo H X, et al. *Anal Chem*, 2019, 91(23): 15040