

UPLC-Q-TOF-MS^E技术研究白头翁皂苷在正常和溃疡性结肠炎模型大鼠体内代谢

陈 龙, 张民权, 司梦洁, 欧阳梦琪, 周良良*, 陈振华*

(江西科技师范大学药学院, 江西省药物分子设计与评价重点实验室, 江西 南昌 330013)

摘要: 本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱-全信息串联质谱 (UPLC-Q-TOF-MS^E) 联用技术结合 UNIFI 分析平台快速分析鉴定常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 (白头翁皂苷 D)、齐墩果酸 3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)-[β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 (白头翁皂苷 B₁) 和常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 (白头翁皂苷 BD) 在正常和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 模型大鼠血浆及结肠组织中的代谢产物。主要依据化合物精确分子量、保留时间、中性丢失以及文献报道数据等信息建立数据库和分析方法, 然后通过与空白对照组比较, 结合偏差和化合物裂解规律筛选获得最终数据。结果表明, 白头翁皂苷 D、B₁ 和 BD 在正常和 UC 模型大鼠血浆及结肠组织中主要发生脱糖、羟基化和脱羟基化、甲基化和脱甲基化、脱氢、脱羧、水解反应。通过本文研究, 将阐明白头翁皂苷 D、B₁ 和 BD 在大鼠体内的代谢转化, 确定进入体内的原形成分及其代谢物, 以及结肠损伤是否会对它们的体内代谢产生影响, 以探索白头翁皂苷 D、B₁ 和 BD 原形或代谢产物中可能的抗结肠炎有效成分。本实验获得江西科技师范大学动物伦理委员会批准 (批准号: Y202227)。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS^E; 白头翁皂苷; 代谢产物; 溃疡性结肠炎

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2754-09

Study on metabolism of *Pulsatilla* saponin in normal and ulcerative colitis model rats by UPLC-Q-TOF-MS^E technology

CHEN Long, ZHANG Min-quan, SI Meng-jie, OUYANG Meng-qi,
ZHOU Liang-liang*, CHEN Zhen-hua*

(School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Jiangxi Province Key
Laboratory of Drug Design and Evaluation, Nanchang 330013, China)

Abstract: In this study, ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer-MS^E (UPLC-Q-TOF-MS^E) combined with UNIFI analysis platform was used to rapidly analyze and identify the metabolites of hederagenins 3-*O*- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabopyranoside (*Pulsatilla* saponin D) and oleanolic acid 3-*O*- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -*D*-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabopyranoside (*Pulsatilla* saponin B₁) and hederagenins 3-*O*- α -L-rhamnosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabopyranoside (*Pulsatilla* saponin BD) in plasma and colonic tissue of normal and ulcerative colitis (UC) rats. The database and analysis methods were established based on the precise molecular weight of compounds, retention time, neutral loss and reported data, and then the final data were obtained by comparing with the blank control group, combining with the devia-

收稿日期: 2022-11-30; 修回日期: 2023-02-27.

基金项目: 江西省杰出青年基金 (20224ACB216019); 江西省自然科学基金青年基金 (20202BABL216026); 江西省药物分子设计与评价重点实验室开放基金 (JKLDE-EF-2104); 江西科技师范大学大学生创新创业项目 (20221604120).

*通讯作者 E-mail: 1020190806@jxstnu.edu.cn; zhenhuachen@jxstnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1309

tion and the cracking rule of the compound. The results showed that the glucoses, hydroxylation and dehydroxylation, methylation and demethylation, dehydrogenation, decarboxylation and hydrolysis of saponin D, B₇ and BD occurred in the plasma and colon tissues of normal and UC model rats. This study will clarify the metabolic transformation of *Pulsatilla* saponins D, B₇ and BD in rats, determine the prototype components and their metabolites that enter the body, and whether colon injury will affect their metabolism *in vivo*, so as to explore the possible anti-colitis effective components in the prototype or metabolites of *Pulsatilla* saponins D, B₇ and BD. This experiment was approved by Animal Ethics Committee of Jiangxi Science and Technology Normal University (approval number: Y202227).

Key words: UPLC-Q-TOF-MS^E; *Pulsatilla* saponin; metabolite; ulcerative colitis

中药白头翁 [*Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel] 为毛茛科多年生草本植物, 始载于《神农本草经》, 味苦、性寒; 归胃和大肠经; 具有清热解毒、凉血止痢、祛湿杀菌的作用^[1]。白头翁总皂苷是白头翁的主要活性成分, 通过提取、分离和纯化获得。现代药理学研究表明, 白头翁总皂苷具有抗炎、抗肿瘤、抗菌抗病毒、抗氧化等作用^[2-5]。溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种慢性非特异性炎症性疾病, 其病因尚不清楚, 病变大多位于乙状结肠和直肠, 也可延伸至降结肠, 甚至整个结肠^[6,7]。目前 UC 的治疗主要包括手术和药物治疗。氨基水杨酸是主要的治疗药物, 如磺胺嘧啶、美沙拉秦和皮质类固醇药物, 如强的松、地塞米松。但临床实践表明, 这些药物存在疗程长、停药后易复发、不良反应多、疗效不理想等缺点^[8,9]。白头翁作为药用植物, 在古代典籍中白头翁汤就被用来治疗肠炎, 现代临床研究也证实白头翁具有抗炎、抗氧化以及增强免疫的作用。

Liu^[10]研究表明, 白头翁皂苷 D、B₇ 和 BD 均为白头翁总皂苷提取物的主要活性成分, 并且本课题组前期研究表明 D、B₇ 和 BD 在白头翁总皂苷提取物中含量较高。综合考虑, 本文选择研究白头翁皂苷 D、B₇ 和 BD 在大鼠体内的代谢转化过程。白头翁的主要成分是三

萜皂苷, 三萜皂苷根据母核结构可分为齐墩果烷型和羽扇豆烷型两大类^[11-14]。白头翁皂苷均为五环三萜类皂苷, 其苷元类型主要有常春藤皂苷元、齐墩果酸皂苷元和 2,3-羟基白桦酸皂苷元三类^[15]。本文研究的白头翁皂苷 D 和 BD 为常春藤皂苷元类皂苷, B₇ 为齐墩果酸皂苷元类皂苷, 结构如图 1 所示。

UPLC-Q-TOF 联用技术以 UPLC 作为分离系统, Q-TOF 为检测系统。样品在 Q-TOF 被离子化后, 将离子碎片按质量数分开, 经检测器得到质谱图^[16,17]。Q 和 TOF 串联起来, 可以更准确地了解化合物裂解后离子碎片的质量数^[18]。MS^E 是在一次液质分析中同时获得高精度的母离子及碎片离子信息的串联质谱方法, 由“无碰撞能”与“高碰撞能”两种扫描交替构成, 分别记录母离子及碎片信息, 通过母离子与其碎片离子具有相同色谱行为的特性进行母-子离子的关联归属, 具有全面、精准、简单和灵活的特点。

材料与方法

仪器 ACQUITY UPLC system Xevo G2-XS QTOF 超高效液相色谱系统-四极杆串联飞行时间质谱仪 (美国 Waters 科技有限公司); LC-DCY-24G 干式氮吹浓

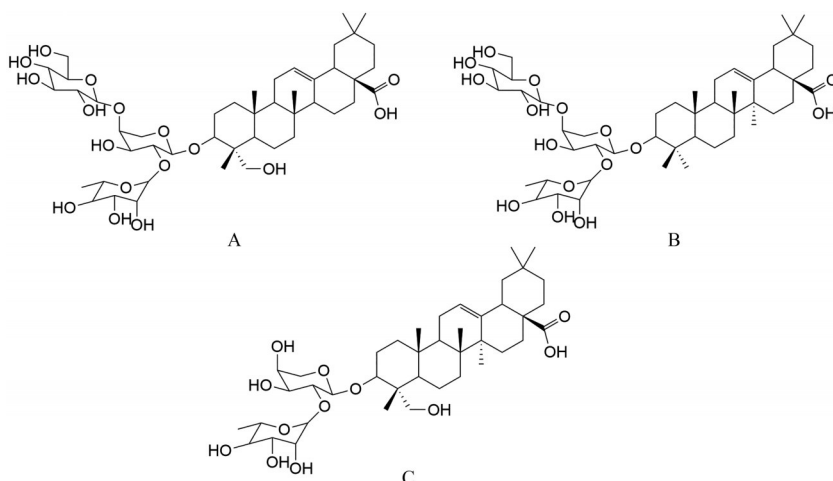


Figure 1 Chemical structural formulas of *Pulsatilla* saponins D (A), *Pulsatilla* saponins B₇ (B) and *Pulsatilla* saponins BD (C)

缩仪(上海力辰邦西仪器科技有限公司); HC-3018R 台式高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); XW-80A 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂); ISO 9001 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; XS205 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); R104 匀浆机(德国 IKA 公司); R510-29 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

试剂 D 对照品(批号: 20130622, 纯度 $\geq 98\%$)、B₇ 对照品(批号: 20140521, 纯度 $\geq 98\%$)、BD 对照品(批号: 20130407, 纯度 $\geq 98\%$)、白头翁提取物(批号: 20121022) 均购于中药固体制剂制造技术国家工程研究中心; 2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitro-benzenesulfonic acid, TNBS, 美国 Sigma 公司); 分析纯多聚甲醛、分析纯水合氯醛均购于天津大茂化学试剂厂; 质谱级甲酸[阿拉丁试剂(上海)有限公司]; 质谱级乙腈(德国 Merck 公司)。

混合对照品的制备 精密称取白头翁皂苷 D 7.56 mg、白头翁皂苷 B₇ 3.48 mg 和白头翁皂苷 BD 1.69 mg 的对照品置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解定容作为对照品储备液。

实验动物 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠, 体重(240 \pm 12) g, 购于南京科瑞斯(Crisbio)生物科技有限公司, 合格证号: XK(南京)2022-0002, 本实验获得江西科技师范大学动物伦理委员会批准(批准号: Y202227)。采用普通饲料进行适应性饲养一周后, 开始建模。喂食期间允许自由饮水。喂料环境: 室温, $T = 22 \pm 1$ °C; 湿度, RH = (50 \pm 10)%; 照明, 一天 12 h。

SD 大鼠造模 适应性饲养结束后, 动物随机分为正常组(N)和模型组(M), 每组 12 只。模型组选用造模剂量为 60 mg·kg⁻¹ 的 TNBS 按每只 4 mL·kg⁻¹。配制 10% 水合氯醛, 按 2 mL·kg⁻¹ 对大鼠腹腔注射进行麻醉后, 造模针吸取相应造模液后在外层涂上凡士林, 由肛门缓慢插入深度大约为 7~8 cm, 轻轻推完药液后拔出并按照上述方法注入 0.5 mL 空气, 操作结束后将大鼠提尾倒置 30 s 左右, 仰卧放回笼中, 待其苏醒后自由饮食。24 h 后, 从正常组和模型组大鼠中随机各取 6 只, 进行大鼠疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分, 然后解剖大鼠, 取盲肠后端到肛门前 3 cm 处结肠, 钢尺测其长度, 用冰生理盐水冲洗内容物, 吸干水分, 取结肠前端 1 cm [小鼠远端结肠组织(距肛门 0.5 cm)] 置于 4% 多聚甲醛中固定(剩余部分置于无菌管中, -80 °C 冷冻保存), 对结肠进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色, 观察结肠是否发生病理改变, 判断是否造模成功。

SD 大鼠灌胃给药 确定造模成功后, 正常组和模

型组大鼠均禁食 12 h, 正常饮水。禁食后的大鼠灌胃给予白头翁皂苷提取物 500 mg·kg⁻¹, 正常给药组和模型组给药组均按 10 mL·kg⁻¹ 容量灌胃给药。正常给药组和模型组的大鼠分别于给药后 0、0.5、1、2、4、8、12、24 h 眼眶静脉采血($n = 6$), 置于肝素钠浸润的 1.5 mL 离心管中, 血全部取净后将结肠剪下。血样经离心后(4 °C、4 500 r·min⁻¹ 离心 10 min) 取上清得血浆样品; 结肠用生理盐水冲洗三次, 并用滤纸吸干水分。所有样品置于 -80 °C 冰箱中保存待测。

SD 大鼠血浆与结肠组织样品处理 每个组织样品准确称量 100 mg, 并加 3 倍体积的冰生理盐水(1 g : 3 mL) 匀浆, 匀浆与血浆的处理方法相同。首先将 6 只大鼠相同时间点(0、0.5、1、2、4、8、12、24 h)($n = 6$) 的血浆分别充分涡旋混合, 然后每个时间点各取血浆 200 μ L 置于 2 mL 离心管中, 加入 600 μ L 乙腈沉淀蛋白, 涡旋 5 min 后在 4 °C 条件下离心 15 min, 转速为 12 000 r·min⁻¹。离心结束后每个离心管中各取上清液, 在 40 °C 氮气吹干, 残渣用 100 μ L 甲醇重新溶解, 再次离心, 将所有时间点的上清液合并至一个离心管中, 再次进行浓缩, 100 μ L 复溶剂复溶并离心。最后得到 80 μ L 上清液置于样品瓶中进样分析。

LC/MS 条件 色谱条件: UPLC-Q-TOF, ACQUITY UPLC system Xevo G2-XS QToF(美国 Waters 科技有限公司); 色谱柱: ACQUITY™ PREMIER BEH C18 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 粒径 1.7 μ m); 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 2 μ L; 流动相由含 0.1% 甲酸的超纯水(A)和乙腈(B)组成, 梯度洗脱程序如下: 0~5 min, 10%~55% B; 5~14 min, 55%~95% B; 14~16 min, 95% B; 16.1~18 min, 10% B。

质谱条件: 采用正离子电喷雾离子化(ESI)方式; 毛细管电压: 2.00 kV; 锥孔电压: 50 V; 离子源温度: 100 °C; 锥孔气流速: 50 L·h⁻¹; 脱溶剂气流速: 800 L·h⁻¹; 扫描模式: MS^E; 进样方式为液相进样; m/z 扫描范围: 50~1 400; 扫描时间: 0.2 s; 碰撞能量: 25 eV。

数据处理 统计分析及画图软件采用 GraphPad Prism 8.0, 各组实验数据均值以 mean \pm SD 表示, 显著差异以 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 表示。

结果

1 TNBS 诱导大鼠 UC 模型建立

1.1 结肠长度变化 如图 2 所示, 图 2A 是正常组和模型组大鼠结肠长度的分析, 模型组结肠长度显著低于正常组, 说明造模结果较好。图 2B 也展现出较好的炎症造模结果, 相较于正常对照组, 模型组结肠明显缩短并发生肿胀变形充血。

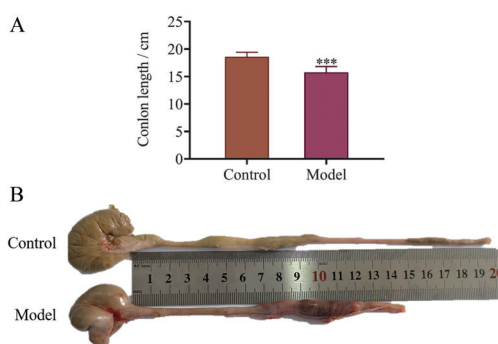


Figure 2 Analysis of colonic changes in rats. A: Colon length; B: Colon image. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group

1.2 大鼠 DAI 评分 造模后大鼠出现萎靡, 进食量少并且伴有肛门出血等症状。按表 1 进行 DAI 评分, 正常对照组大鼠 DAI 评分为 0, 模型组大鼠 DAI 评分为 2.56 ± 0.40 , 相较于正常对照组具有显著性差异 ($P < 0.01$), 表现出较好的 UC 造模效果。

1.3 结肠组织病理学观察 由图 3 大鼠结肠组织病理切片图可知, 正常对照组大鼠腺体排列整齐, 隐窝无明显变形受损情况, 无炎性细胞浸润, 杯状细胞形态正常。与正常对照组相比, 模型组大鼠隐窝存在不规则肿大变形甚至消失, 杯状细胞结构受到破坏甚至消失, 炎性细胞浸润严重。以上结果表明, TNBS 诱导的 UC 模型大鼠造模成功。

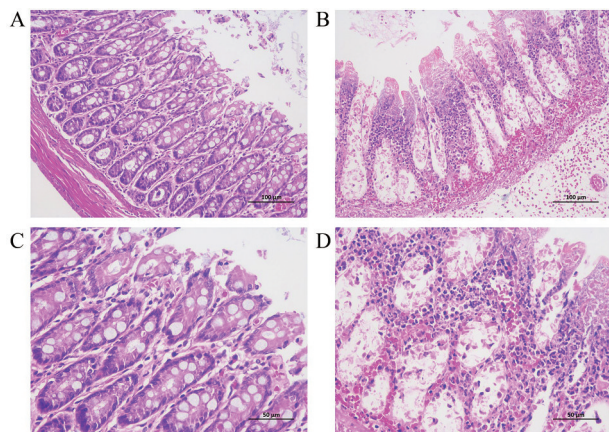


Figure 3 The HE stained sections of colonic tissue of rats. A: Control 200 \times ; B: Model 200 \times ; C: Control 400 \times ; D: Model 400 \times

2 正常和 UC 大鼠灌胃白头翁皂苷提取物后体内原形及代谢产物鉴定

通过 UPLC-Q-TOF-MS^E 高分辨率质谱在正离子模式下采集正常大鼠和 UC 模型大鼠灌胃白头翁皂苷提取物后的质谱数据。采用 UNIFI 分析软件, 通过查阅文献自建数据库和分析鉴定方法, 结合白头翁皂苷 D₇、B₇ 和 BD 对照品, 提供精确分子量、保留时间以及中性丢失, 同时, 综合考虑化合物裂解规律, 高效鉴定白头翁皂苷 D₇、B₇ 和 BD 在正常和 UC 大鼠血浆和结肠组织中的代谢产物, 质量数偏差不超过 5×10^{-6} 。

由表 2、3 可知, 白头翁皂苷在正常和 UC 模型大鼠血浆和结肠组织中主要发生脱葡萄糖、脱鼠李糖、脱阿拉伯糖、羟基化和脱羟基化、甲基化和脱甲基化、脱氢、脱羧、水解反应。由表 2 和图 4 可知, 相较于正常对照组大鼠, 白头翁皂苷 D 在 UC 大鼠血浆中可发生脱葡萄糖+脱鼠李糖+羟基化 ($D-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_4$)、脱鼠李糖 ($D-C_6H_{10}O_4$)、脱羟基化 ($D-O$)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱甲氧基化/脱羟甲基化/脱羟基化+脱甲基化 ($D-C_{17}H_{28}O_{14}-CH_2$)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+甲氧基化/羟甲基化/甲基化+羟基化 ($D-C_6H_{10}O_6-C_5H_8O_4$) 和脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱双羟基化 ($D-C_6H_{10}O_6-C_6H_{10}O_5$); 白头翁皂苷 B₇ 在 UC 大鼠血浆中可以脱葡萄糖+脱双羟基化/脱鼠李糖+脱三羟基化 ($B_7-C_6H_{10}O_6-O$)、原形 (B_7)、脱鼠李糖 ($B_7-C_6H_{10}O_4$)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+甲基化 ($B_7-C_6H_{10}O_5-C_5H_8O_4$)、脱葡萄糖+脱羧/脱鼠李糖+脱羟基化+脱羧 ($B_7-C_6H_{10}O_5-COO$)、脱葡萄糖+甲氧基化/羟甲基化/羟基化+甲基化或者脱鼠李糖+甲基化 ($B_7-C_5H_8O_4$) 形式存在; 白头翁皂苷 BD 在 UC 大鼠血浆中可发生脱鼠李糖+水解 ($BD-C_6H_{10}O_4+H_2O$)、脱鼠李糖+脱羟基+甲基化 ($BD-O-C_5H_8O_4$)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱甲基 ($BD-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_4$)、脱鼠李糖 ($BD-C_6H_{10}O_4$)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羧 ($BD-C_{11}H_{18}O_8-COO$)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化 ($BD-C_{11}H_{18}O_9$)、脱鼠李糖+脱双羟基化 ($BD-O-C_6H_{10}O_5$)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱甲氧基化/脱羟甲基化/脱羟基化+脱甲基化 ($BD-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5$)。

Table 1 The DAI score. Normal feces = formed and normal hardness of feces; loose stools = soft, mushy feces that do not stick to the anus; diarrhea = liquid feces sticking to the anus. Weight loss/% = (body weight at some point during the administration period - body weight before modeling) / body weight before modeling $\times 100\%$; DAI = (weight loss score + fecal shape score + occult blood score) / 3

Weight loss / %	Shape of feces	Bloody stool	DAI
0	Normal	No	0
1-5	Between normal and loose stools	Weak positive	1
6-10	Loose stools	Positive	2
11-15	Between loose stools and diarrhea	Visible to the naked eye but without adhesion	3
>15	Diarrhea	Blood stool is visible to the naked eye	4

Table 2 Metabolites of *Pulsatilla* saponins D, B₇ and BD in rat plasma

No.	Component	Formula	Observed <i>m/z</i> Control/model	Mass error/10 ⁻⁶ Control/model	Observed RT/min Control/model	Adducts Control/model	Response Control/model
1	D-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	751.465 1/789.419 8	3.1/1.6	4.97/6.29	H/K	5 127/5 600
2	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	495.345 8	2.6	12.55	Na	27 845/0
3	D+O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	967.466 4/929.510 5	0.1/0.1	7.06/9.47	K/H	7 546/6 077
4	D-H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	949.458 5/949.456 7	2.9/1	8.15/7.34	K/K	8 151/4 901
5	D-CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₇	899.500 6/921.482 9	0.8/1.2	8.47/12.96	H/Na	19 818/12 786
6	D-COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₅	891.510 3/869.526 4	3/0.8	5.67/8.59	Na/H	7 709/5 978
7	D+H ₂ O	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₈	931.526 9/953.508 7	0.8/0.6	11.36/7.02	H/Na	5 470/9 916
8	D-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₂	771.432 7	4.9	2.63	Na	6 537/0
9	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂ O	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	823.424 5/785.469	0.5/1	6.8/9.57	K/H	17 274/3 950
10	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₁₁	761.423 7	0	5.84	K	4 777/0
11	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₃	753.442 6/791.398 1	0.8/0.3	7.97/7.35	H/K	8 115/12 102
12	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	765.443 5	2.1	9.38	H	4 603/0
13	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ +O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	805.435 6/821.409 6	1.4/1.4	13.01/2.84	Na/K	3 955/7 780
14	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ +O	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	527.313 9/489.358 7	1/2.7	7.99/12.54	K/H	119 749/11 581
15	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ -CH ₂	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	459.348 1	2.6	12.62	H	9 994/0
16	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	491.373 6/491.374 9	0.9/3.6	13.73/13.69	H/H	8 455/7 244
17	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₉	691.478 4/713.461 6	0.6/2.3	13.66/13.38	H/Na	14 856/8 616
18	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	673.371 4/673.371 6	0.3/0.5	12.95/7.37	K/K	5 035/7 621
19	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	621.400 1/643.382 7	0.6/1.6	5.18/7.33	H/Na	5 230/26 669
20	D-C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	781.474 7/819.431 4	1.8/2.7	6.82/7.1	H/K	6 542/10 044
21	D-C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	805.417 4	4.8	7.26	K	0/6 202
22	D-O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	897.521	0.5	11	H	0/5 795
23	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -CH ₂	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	465.334 3	0.9	7.27	Na	0/19 233
24	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	625.409 5	3.2	13.48	Na	0/7 175
25	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₆	573.417 4	4.2	13.66	H	0/22 432
26	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	757.450 1/773.424 4	0.4/1	9.8/7.26	Na/K	8 082/9 606
27	B ₇ +O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	935.500 3/913.517	3/1.7	6.28/8.76	Na/H	7 701/7 087
28	B ₇ -O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₅	881.525 8/919.482 6	0.1/1.1	12.75/7.04	H, Na/K	8 191/8 136
29	B ₇ -H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₆	917.487 3/917.488 7	0.5/2	11.29/12.82	Na/Na	10 177/11 273
30	B ₇ +H ₂	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₆	937.494 4	2.4	8.48	K	6 836/0
31	B ₇ -COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₄	853.530 9	0.1	10.11	H	4 660/0
32	B ₇ -CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	883.507 5/905.490 9	2.8/4.4	5.67/6.25	H/Na	14 903/6 939
33	B ₇ -O-COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₃	859.518 2/859.518 6	0.5/0.9	12.06/11.07	Na/Na	29 821/21 702
34	B ₇ -O-H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₅	879.512 8/901.492 1	3.2/0.2	9.67/13.94	H, Na/Na	14 434/14 080
35	B ₇ -O-O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₄	903.487/903.487 4	0.4/0.8	12.52/11.87	K/K	5 036/9 603
36	B ₇ -O-CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₅	905.469 5/889.492 3	4/0.3	12.53/7.61	K/Na	4 609/10 860
37	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	479.328 6/479.328 9	0/0.7	10.52/11.66	K/K	79 947/63 283
38	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -COO	C ₂₉ H ₄₈	397.384 1	2.9	6.67	H	13 295/0
39	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₅	595.376 4/595.376 1	0.7/0.3	9.85/9.87	K/K	45 670/17 705
40	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₆	625.388 1	2.6	8.23	K	6 273/0
41	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	439.357 2/439.357 2	0.4/0.4	8.11/8.09	H/H	8 547/5 433
42	B ₇ -O-C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₁	787.439 4/749.485 1	0.1/2.3	11.73/10.16	K/H	4 655/4 557
43	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₀	741.455 9/757.430 2	1.5/1.9	8.31/10.02	Na/K	4 671/4 924
44	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₀	755.413 4/755.416 1	0.5/4.1	7.43/7.67	K/K	8 849/7 001
45	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₀	727.439 2/727.439 3	0/0.1	7.97/7.98	Na/Na	5 718/6 528
46	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₈	713.439/697.465 5	0/0.7	9.77/12.49	K/Na	24 870/48 005
47	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -O	C ₄₁ H ₆₆ O ₉	725.461 3/703.478 2	2/0.3	10.07/11.11	Na/H, K	4 199/25 664
48	B ₇	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	935.477 5	1	6.26	K	0/7 081
49	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	751.462 8	0.2	8.81	H	0/5 955
50	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	603.426 2	1.1	11.34	H	0/37 550
51	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₉	691.478 5	0.7	12.83	H	0/106 854
52	B ₇ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	787.460 7	0.6	10.65	Na	0/7 220
53	BD+H ₂ O	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₃	769.475/769.473 9	2.2/0.7	13/7.55	H/H	23 129/20 010
54	BD-CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₂	737.447 8/759.429 3	1.1/0.5	13.94/7.44	H/Na	18 030/38 006
55	BD-COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₁₀	707.473	0.2	13.95	H	60 807/0
56	BD-H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₂	771.430 3/771.430 6	1.8/2.1	7.46/7.46	Na/Na	42 644/52 165
57	BD-O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	773.427 2	4.5	7.27	K	13 721/0
58	BD+O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	805.416 7/805.413 7	4/0.3	6.82/7.01	K/K	4 911/13 094
59	BD+H ₂	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₂	775.460 4/753.479 1	0.1/1	11.3/11.5	Na/H	7 640/4 589

Continued

No.	Component	Formula	Observed <i>m/z</i>		Mass error/10 ⁻⁶		Observed RT/min		Adducts	Response
			Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model		
60	BD-C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	619.420	8/657.378	4	0.6/3.1	9.12/11.38	H/K	3 774/6 753	
61	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	589.411	8/627.367	2	3.2/2.4	5.86/8.2	H/K	4 726/4 322	
62	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +O	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	643.382	2/643.384		0.9/3.7	5.88/6.12	Na/Na	4 498/8 012	
63	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -CH ₂	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	613.372	1/613.371	3	1.6/0.3	5.19/5.19	Na/Na	30 767/4 713	
64	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -COO	C ₃₄ H ₅₆ O ₆	599.371	1/599.371	1	0.4/0.3	10.34/13.93	K/K	6 800/7 022	
65	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂ O	C ₃₅ H ₅₈ O ₉	645.399	6/623.415	5	2.6/0.1	8.49/9.3	Na/H	4 009/23 320	
66	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -H ₂	C ₃₅ H ₅₄ O ₈	603.390	5/603.389	1	2.3/0.1	13.93/6.11	H/H	14 460/6 641	
67	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	645.377	4/629.403	5	1.6/1.7	13.38/12.67	K/Na	5 350/6 026	
68	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +O	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	527.313	9/527.314	2	1/1.7	7.99/8.01	K/K	119 749/114 250	
69	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	509.303	4/493.330	1	0.5/2.7	2.23/4.35	K/Na	4 749/11 811	
70	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +H ₂	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.334	7		1.2	5.68	K	14 884/0	
71	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	491.373	2/513.355	7	0.1/1.2	13.91/8.82	H/Na, K	19 016/40 451	
72	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂	C ₃₅ H ₅₄ O ₇	625.350	3/625.350	6	0.5/0.9	6.8/12.45	K/K	7 052/11 814	
73	BD-O-C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	603.426	7/641.381	7	1.9/0.5	12.05/6.67	H/K	5 738/48 593	
74	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	493.308	8/477.334	6	2.1/1.5	12.31/10.59	K/Na	6 236/13 333	
75	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.334	3/513.334	6	0.3/0.9	5.68/12.52	K/K	14 766/15 947	
76	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O	435.359	8/435.360	5	0/1.6	12.72/12.72	Na/Na	22 698/20 982	
77	BD-O-CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	743.436	5/759.409	5	3.3/1.9	8.84/8.81	Na/K	4 235/3 902	
78	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -CH ₂	C ₃₄ H ₅₄ O ₇	613.350	5/613.352	5	0.7/3.9	6.3/6.28	K/K	19 740/26 364	
79	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -COO	C ₃₄ H ₅₆ O ₅	583.376	1/545.420	3	0.2/0.4	12.08/7.91	K/H	10 939/15 530	
80	BD-O-COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₉	691.478	6/691.478	7	0/1	11.81/6.47	H/H	47 763/23 912	
81	BD-O-H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₁	771.409	2/755.435	8	1.6/2.3	6.82/11.35	K/Na	10 197/7 052	
82	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	459.347	3/459.347	6	0.9/1.5	8.44/7.85	H/H	8 885/35 279	
83	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	465.313	3/427.358	5	0.7/3.5	10.31/11.46	K/H	4 613/13 946	
84	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	643.360	7		0	13.96	K	0/5 699	
85	BD-O-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₆	573.415	6		1	13.65	H	0/26 037	
86	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	451.356	3		3.5	10.25	Na	0/9 137	
87	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	495.324	8		2.6	13.53	K	0/10 075	
88	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	481.309	3		2.9	13.72	K	0/7 269	

Table 3 Metabolites of *Pulsatilla* saponins D, B₇ and BD in rat colonic tissues

No.	Component	Formula	Observed <i>m/z</i>		Mass error/10 ⁻⁶		Observed RT/min		Adducts	Response
			Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model		
1	D-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	789.420	9/789.419	1	2.9/0.7	3.25/2.88	K/K	108 855/60 695	
2	D-C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	805.415	3/805.414	4	2.2/1.1	2.24/2.84	K/K	20 094/18 387	
3	D+O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	929.510	5/951.492	9	0.1/0.6	8.75/5.89	H/Na	20 419/13 748	
4	D-O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	919.503	4/919.504	3	1/1.9	4.14/4.1	Na/Na	31 452/56 391	
5	D-CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₇	921.483	5/899.5		1.9/0.1	2.89/4.5	Na/H	46 687/53 159	
6	D-H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	911.501	3/911.501	5	1.6/1.8	4.19/4.5	H/H	69 496/78 980	
7	D+H ₂	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₇	953.489	9/937.514	5	2/1.5	3.34/4.8	K/Na	71 476/8 257	
8	D-COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₅	907.482	6/891.508	3	1.1/0.8	3.43/5.73	K/Na	83 532/10 603	
9	D+H ₂ O	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₈	953.508	8/931.526	4	0.8/0.3	3.7/4.4	Na/H	40 623/90 484	
10	D-C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	781.474	7/819.430	5	1.8/1.6	5.88/3.04	H/K	14 481/88 269	
11	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂ O	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	807.450	8/807.451	1	0.8/1.2	4.77/5.08	Na/Na	24 193/16 626	
12	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ +O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₄	805.437	4/805.436	6	3.7/2.7	3.08/4.13	Na/Na	93 835/22 083	
13	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₃	775.424	5/775.424	4	0.7/0.7	4.2/4.47	Na/Na	26 534/6 569	
14	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	673.371	3/635.415	6	0.1/0.4	3.47/11.77	K/H	20 694/15 191	
15	D-O-C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	803.434	6		0.5	3.19	K	117 191/0	
16	D-C ₆ H ₁₀ O ₅ +H ₂	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₂	791.435	9/753.480	2	2.1/2.4	4.91/8.63	K/H	99 027/16 041	
17	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₁	771.408	6/733.453	4	0.8/1.8	2.62/8	K/H	84 814/15 340	
18	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	759.411	6/759.409	1	4.7/1.4	3.33/3.13	K/K	48 269/51 502	
19	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₁₁	723.468	3/745.450	8	0.7/1.3	9.02/6.18	H/Na	12 140/10 065	
20	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ +O	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	489.357	5/489.359		0/3.1	12.2/13.2	H/H	14 705/19 746	
21	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	787.424	1/765.442	5	0.3/0.7	2.22/5.75	Na/H	50 214/8 164	
22	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	643.382	4/621.400	2	1.2/0.7	12.99/12.04	Na/H	6 709/30 223	
23	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	479.35	4/495.324	7	0.9/2.4	13.21/13.63	Na/K	14 363/24 162	
24	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	509.304	1/509.302	7	2.8/0	7.45/5.29	K/K	13 725/24 066	
25	D-C ₆ H ₁₀ O ₄ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	765.443	2/765.442	5	1.7/0.7	4.41/5.75	H/H	27 572/8 164	

Continued

No.	Component	Formula	Observed <i>m/z</i>		Mass error/10 ⁻⁶		Observed RT/min		Adducts	Response
			Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model	Control/model		
26	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -CH ₂	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	481.308	6/481.308	5	1.5/1.2	8.61/8.6	K/K	255 231/346 737	
27	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	467.329	451.355	7	0.7/2.2	13.82/9.3	K/Na	77 424/15 414	
28	D-O-COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₄	891.49			3.7	5.28	K	0/14 816	
29	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.335	7		3.1	13.6	K	0/11 923	
30	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	493.31			4.5	8.47	K	0/33 683	
31	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	603.426	5		1.7	13.61	H	0/40 288	
32	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ +H ₂	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.336	6		4.8	9.51	K	0/40 680	
33	D-C ₆ H ₁₀ O ₆ +H ₂	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₁	737.483	6		0.1	9.01	H	0/61 016	
34	D-C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	491.373	6		1	12.67	H	0/22 717	
35	B ₇ +O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	935.497	5/935.497	9	0/0.5	3.59/3.87	Na/Na	47 290/35 429	
36	B ₇ -O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₅	881.525	9/903.507	9	0.2/0.3	12.27/5.61	H/Na	26 154/35 546	
37	B ₇ +H ₂	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₆	937.494	5		2.5	3	K	87 115/0	
38	B ₇ -O-H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₅	901.492	8/901.493	5	1/1.7	4.12/4.16	Na/Na	25 466/26 944	
39	B ₇ -H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₆	917.486	9/917.487	1	0/0.2	2.28/3.51	Na/Na	30 488/40 373	
40	B ₇ -CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	905.489	3/905.487		2.6/0.1	4.26/3.78	Na/Na	30 161/32 281	
41	B ₇ -O-O	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₄	903.487	6/903.487	3	1/0.7	4.39/4.16	K/K	36 566/66 013	
42	B ₇ -O-CH ₂	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₅	889.492	7/889.492	7	0.8/0.8	4.74/3.74	Na/Na	23 904/18 060	
43	B ₇ -O-COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₃	875.494	1/875.492	7	2.7/1.1	7.94/6.21	K/K	12 869/14 388	
44	B ₇ -O-H ₂	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₅	901.492	6/901.493	5	0.7/1.7	3.41/4.16	Na/Na	44 174/26 944	
45	B ₇ -C ₃ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₂	787.462	7/803.434	8	3.1/0.7	7.06/4.56	Na/K	129 860/12 834	
46	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	789.419	5/751.464		1.2/1.7	2.29/6.43	K/H, Na	48 339/12 218	
47	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	773.423	9/735.470	9	0.3/4.3	4.38/6.34	K/H	20 400/11 425	
48	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₀	757.43/741.454	8		1.7/0	5.24/9.32	K/Na	11 166/10 315	
49	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	759.41/759.409	5		2.6/2	2.65/3.54	K/K	149 690/53 458	
50	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -O	C ₄₁ H ₆₆ O ₉	741.434	6/703.478	5	1/0.7	12.78/13.18	K/H	10 227/35 034	
51	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₀	717.458	7/755.413	3	2.1/0.3	12.55/4.59	H/K	85 853/24 495	
52	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₀	743.413	2/727.439	7	0.1/0.7	4.09/6.3	K/Na, K	29 844/8 825	
53	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₈	697.465	4/713.440	3	0.5/1.9	11.62/7.3	Na/K	11 276/21 973	
54	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ -CH ₂	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	481.309	2		2.7	8.62	K	211 998/0	
55	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₃ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	493.308	5		1.5	10.07	K	40 743/0	
56	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₆	625.389	1/625.388	8	4.2/3.7	8.54/10.41	K/K	9 580/5 188	
57	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -O	C ₃₀ H ₄₈ O	463.335	9		4.8	12.82	K	19 180/0	
58	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O	435.339	5/435.339	2	1.7/1	13.34/13.92	K/K	11 944/56 962	
59	B ₇ -O-C ₅ H ₈ O ₄	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₁	771.466	8/787.439	9	1.8/0.8	11.92/6.19	Na/K	16 627/8 097	
60	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	439.357	2/477.313	8	0.5/2	8.09/13.85	H/K	23 403/12 761	
61	B ₇ +H ₂ O	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₇	953.488	9		1.9	3.33	K	0/29 658	
62	B ₇ -COO	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₄	853.531	7		1	5.17	H	0/43 530	
63	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₆ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₅	595.377	2		2.1	7.57	K	0/7 876	
64	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	479.328	9		0.6	11.25	K	0/12 040	
65	B ₇ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₉	691.481	2		4.6	9.95	H	0/12 941	
66	B ₇ -C ₁₇ H ₂₈ O ₁₄ -CH ₂	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	465.313	4		0.9	9.33	K	0/1 165 099	
67	BD+H ₂	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₂	791.434	8/775.461	2	0.6/1.1	4.2/1.35	K/Na	81 342/7 376	
68	BD-H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₂	771.431	5/787.403	6	3.2/0.9	3.45/6.18	Na/K	111 011/16 846	
69	BD+O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	789.441	3/789.44		2.3/0.5	5.12/3.82	Na/Na	15 250/31 032	
70	BD-O	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	773.426	5/773.424		3.7/0.4	4.12/4.99	K/K	40 625/11 624	
71	BD-CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₂	775.404/759.429	7		1.4/0.9	2.73/4.88	K/Na	67 749/8 444	
72	BD+H ₂ O	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₃	807.430	5/807.431	8	1.6/3.2	3.07/3.82	K/K	77 518/21 700	
73	BD-O-H ₂	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₁	771.408	6/733.452	7	0.8/0.9	2.62/6.2	K/H	84 814/9 081	
74	BD-COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₁₀	745.429	1/707.473	4	0.4/0.7	4.65/13.39	K/H	20 928/16 201	
75	BD-O-CH ₂	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	759.408	9/721.452	4	1.2/0.4	2.65/12.26	K/H	79 974/8 825	
76	BD-C ₃ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	641.402	5/619.420	7	0.1/0.3	4.95/6.19	Na/H	21 666/9 785	
77	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	627.387	8/627.386	8	1.6/0	6.47/6.46	Na, K/Na, K	35 471/39 765	
78	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	627.366	9/627.366	3	1.9/0.8	6.67/6.68	K/K	7 785/10 350	
79	BD-O-COO	C ₄₀ H ₆₆ O ₉	713.460	3/729.437		0.4/4.3	13.15/6.59	Na/K	12 999/5 856	
80	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +O	C ₃₅ H ₅₆ O ₉	659.357	7/659.356	4	3.2/1.2	2.16/3.1	K/K	81 869/13 495	
81	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	607.423	1/607.421	6	4.3/1.8	10.95/11.66	H/H	31 657/20 317	
82	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -H ₂	C ₃₅ H ₅₄ O ₈	641.345	3/603.389	2	0.5/0.2	3.43/13.59	K/H	43 914/30 764	
83	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -CH ₂	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	591.389	4		0.3	13.55	H	30 370/0	
84	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂	C ₃₅ H ₅₄ O ₇	625.350	5/625.350	1	0.7/0.1	3.95/6	K/K	40 402/27 042	

Continued

No.	Component	Formula	Observed <i>m/z</i>		Mass error/10 ⁻⁶	Observed RT/min		Adducts	Response
			Control/model	Control/model		Control/model	Control/model		
85	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -CH ₂	C ₃₄ H ₅₄ O ₇	613.352	8/613.350	5	4.3/0.6	4.79/12.46	K/K	24 221/6 624
86	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +O	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	489.357	5/489.357	5	0/0.1	12.19/10.92	H/H	12 544/63 173
87	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	429.372	9/467.329	9	0.4/2.8	13.67/11.7	H/K	36 852/15 777
88	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ -C ₅ H ₈ O ₄	C ₂₅ H ₄₀	379.276	5/379.276	3	1/0.3	10.84/10.83	K/K	965 622/697 222
89	BD-O-C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₃₅ H ₅₆ O ₆	595.397		3	0.7	11.83	Na	13 504/0
90	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	495.323	6/495.323	5	0.3/0.1	13.83/13.83	K/K	23 305/19 103
91	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	493.307	9/455.352	1	0.1/0.3	7.84/8.21	K/H	17 576/221 511
92	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	481.308	4/481.307	9	0.4/0.2	13.84/13.18	K/K	22 848/47 263
93	BD-O-C ₅ H ₈ O ₄	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	641.383	5/603.425	9	3.2/0.7	5.2/11.9	K/H	6 478/7 603
94	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	511.319	1/511.319	9	1.3/2.9	9.59/8.54	K/K	11 087/28 943
95	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.335	5/513.334	4	1.7/0.6	6.68/7.44	K/K	30 430/37 103
96	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₄	C ₂₉ H ₄₆ O ₄	481.329	8/481.329	7	2/1.7	13.67/13.65	Na/Na, H	40 215/49 892
97	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +H ₂ O	C ₃₀ H ₅₀ O ₅	513.355	6/513.355	8	1/1.3	8.41/8.49	Na/Na	8 279/23 773
98	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ +H ₂	C ₃₀ H ₅₀ O ₄	513.334	2/513.334	1	0.2/0	12.91/12.97	K/K	23 291/10 070
99	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ +H ₂ O	C ₃₅ H ₅₈ O ₉	645.398			1	8.2	Na	0/12 051
100	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ +H ₂ O	C ₃₅ H ₅₈ O ₈	607.423		4	4.8	10.95	H	0/16 444
101	BD-C ₆ H ₁₀ O ₄ -COO	C ₃₄ H ₅₆ O ₆	583.397		2	0.4	11.75	Na	0/10 612
102	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -COO	C ₃₄ H ₅₆ O ₅	567.402		2	0.3	7.28	Na	0/5 175
103	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₈ -H ₂	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	509.303		9	2.2	6.91	K	0/8 208
104	BD-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅	C ₂₉ H ₄₆ O ₂	465.313		2	0.5	3.59	K	0/23 398
105	BD-C ₁₁ H ₁₈ O ₉ -COO	C ₂₉ H ₄₈ O	435.361		2	3.3	12.69	Na	0/17 548

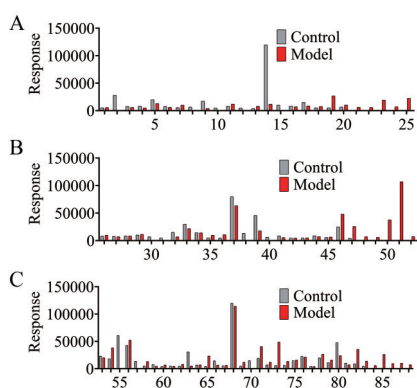


Figure 4 Results of semi-quantitative analysis of the metabolites of *Pulsatilla* saponins D (A), *Pulsatilla* saponins B₇ (B) and *Pulsatilla* saponins BD (C) in rat plasma. The numbers are the same as in Table 2

由表3和图5可知,相较于正常对照组大鼠,白头翁皂苷D在UC大鼠结肠组织中可发生脱羟基化+脱羧(D-O-COO)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+氢化/脱羟基化+水解(D-C₁₇H₂₈O₁₄+H₂O)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化+脱氢(D-C₁₇H₂₈O₁₄-H₂)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+甲氧基化/羟甲基化/羟甲基化+甲基化(D-C₆H₁₀O₆-C₅H₈O₄)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+氢化(D-C₁₇H₂₈O₁₃+H₂)、脱葡萄糖+脱羟基化+氢化/脱鼠李糖+脱双羟基化+氢化(D-C₆H₁₀O₆+H₂)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+水解(D-C₁₇H₂₈O₁₃+H₂O);白头翁皂苷B₇在UC大鼠结肠组织中可发生脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化+脱羧(B₇-

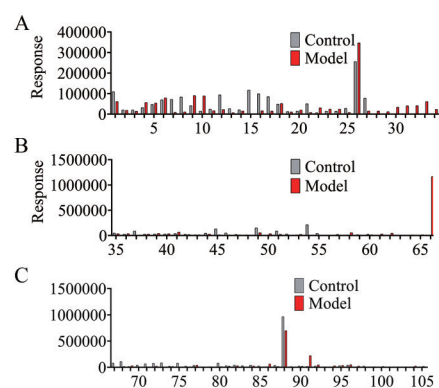


Figure 5 Results of semi-quantitative analysis of the metabolites of *Pulsatilla* saponins D (A), *Pulsatilla* saponins B₇ (B) and *Pulsatilla* saponins BD (C) in rat colonic tissues. The numbers are the same as in Table 3

C₁₇H₂₈O₁₄-COO)、水解(B₇+H₂O)、脱羧(B₇-COO)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱双羟基化(B₇-C₆H₁₀O₆-C₆H₁₀O₅)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化(B₇-C₁₇H₂₈O₁₄)、脱葡萄糖+脱羧/脱鼠李糖+脱羟基化+脱羧(B₇-C₆H₁₀O₅-COO)、脱葡萄糖+脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟甲基化/脱甲氧基化/脱羟基化+脱甲基化(B₇-C₁₇H₂₈O₁₄-CH₂);白头翁皂苷BD在UC大鼠结肠组织中可发生脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化+脱氢(BD-C₁₁H₁₈O₉-H₂)、脱鼠李糖+水解(BD-C₆H₁₀O₄+H₂O)、脱鼠李糖+氢化/脱羟基化+水解(BD-C₆H₁₀O₅+H₂O)、脱鼠李糖+脱羧(BD-C₆H₁₀O₄-COO)、脱鼠李糖+脱羟基化+脱羧(BD-C₆H₁₀O₅-COO)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱

氢 (BD-C₁₁H₁₈O₈-H₂)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+/脱羟基化+脱羟甲基化/脱甲氧基化或脱双羟基化+脱甲基化或脱羧+脱氢 (BD-C₆H₁₀O₅-C₆H₁₀O₅)、脱鼠李糖+脱阿拉伯糖+脱羟基化+脱羧 (BD-C₁₁H₁₈O₉-COO)。

讨论

本文主要证实了白头翁皂苷D、B₇和BD在正常大鼠和UC大鼠血浆和结肠组织中的代谢产物以及两者之间代谢产物的差异。在大鼠灌胃白头翁皂苷提取物的血浆及结肠组织中主要检测到脱葡萄糖、脱鼠李糖、脱阿拉伯糖、羟基化和脱羟基化、甲基化和脱甲基化、脱氢、脱羧、水解代谢产物。重点通过定性、半定量分析研究了正常大鼠和UC大鼠的血浆及结肠组织的代谢差异, 血浆和结肠组织中代谢差异明显, 可能是由于多种多样的肠道菌群引起。值得注意的是, 相较于正常对照组, 在UC大鼠血浆和结肠组织中均发现代谢物D-C₆H₁₀O₆-C₅H₈O₄、B₇-C₆H₁₀O₅-COO和BD-C₆H₁₀O₄+H₂O, 并且在UC大鼠血浆中发现D-C₆H₁₀O₄、B₇-C₆H₁₀O₄和BD-C₆H₁₀O₄, 另构效关系研究表明白头翁皂苷的活性与其母核C-28位羧酸和C-3位侧链糖基有关^[19,20], 因此白头翁皂苷C-3位侧链糖基是否含有鼠李糖(C₆H₁₀O₄)可能是其抗UC的关键, 其中C-3位侧链不含C₆H₁₀O₄的皂苷可能是抗UC的有效成分。

作者贡献: 陈龙负责实验及文章撰写; 张民权负责实验、修改文章; 司梦洁和欧阳梦琪负责文献调研、实验材料收集; 周良良和陈振华负责文章选题、实验方案设计、审阅文章。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 1. 2020 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 108.
- [2] Chen ZH. Design and Evaluation of Multiple Unit Type Colon-targeted Drug Delivery System of *Pulsatilla* (多单元型白头翁结肠靶向给药系统的设计与评价) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2013.
- [3] Lee SH, Lee E, Ko YT. Anti-inflammatory effects of a methanol extract from *Pulsatilla koreana* in lipopolysaccharide-exposed rats [J]. BMB Rep, 2012, 45: 371-376.
- [4] Cao JH, Li YL, Qiu SC, et al. The *in vitro* growth inhibition effect of *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel (PCR) on bacteria [J]. Lishizhen Med Mater Med (时珍国医国药), 2003, 14: 528.
- [5] Luo YY. A Study on Antitumor Effect and Mechanisms of *Pulsatilla chinensis* Saponins (白头翁皂苷抗肿瘤作用及机制研究) [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2014.
- [6] Chen L, Zhou ZY. The research progress of the pathogenesis of ulcerative colitis [J]. Chin J Diffic Complicat Cases (疑难病杂志), 2016, 15: 650-654.
- [7] Kiernan MG, Coffey JC, Mcdermott K, et al. The human mesenteric lymph node microbiome differentiates between Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13: 58-66.
- [8] Nguyen NH, Fumery M, Dulai PS, et al. Comparative efficacy and tolerability of pharmacological agents for management of mild to moderate ulcerative colitis: a systematic review and network meta-analyses [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3: 742-753.
- [9] Dignass A, Schnabel R, Romatowski J, et al. Efficacy and safety of a novel high-dose mesalazine tablet in mild to moderate active ulcerative colitis: a double-blind, multicentre, randomised trial [J]. United European Gastroenterol J, 2018, 6: 138-147.
- [10] Liu YL. Pharmacokinetics Research on the Major Active Components of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel (白头翁皂苷主要活性成分的药代动力学研究) [D]. Suzhou: Soochow University, 2014.
- [11] Ding XJ. Chemical Constituents of *Pulsatilla chinensis* (Bge.) Regel (中药白头翁化学成分研究) [D]. Suzhou: Soochow University, 2010.
- [12] Mimaki Y, Kuroda M, Asano T, et al. Triterpene saponins and lignan from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells [J]. J Nat Prod, 1999, 62: 1279-1283.
- [13] Shi BJ, Li Q, Zhang XQ, et al. Triterpene glycosides from the aerial parts of *Pulsatilla chinensis* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42: 862-866.
- [14] Ye WC, Ji NN, Zhao SX, et al. Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis* [J]. Phytochemistry, 1996, 42: 799-802.
- [15] Lian S, Jiang WX, Xue R. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Rege [J]. Asia-Pacific Tradit Med (亚太传统医药), 2016, 12: 35-38.
- [16] Zhang WJ, Li MM, Zhang F. Liquid mass coupling technique and its application [J]. Shandong Chem Ind (山东化工), 2014, 43: 121-122.
- [17] Xu XH, Qiu GY, Jing WT, et al. The application of liquid chromatography-mass spectrometry technology in the research and development of new drug [J]. E-J Transl Med (转化医学电子杂志), 2018, 5: 90-94.
- [18] Zhang JJ, Jia JP, Qin XM. Applications progress of mass spectrometry in analysis of traditional Chinese medicine [J]. J Instrum Anal (分析测试学报), 2017, 36: 579-587.
- [19] Barthelemy C, Debiton E, Mshvildadze V, et al. *In vitro* activity of hederacolchisid A1 compared with other saponins from *Hedera colchica* against proliferation of human carcinoma and melanoma cells [J]. Planta Med, 2002, 68: 672-675.
- [20] Bang SC, Lee JH, Song GY, et al. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2005, 53: 1451-1454.