

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.01.001

• 基础研究 •

泽泻汤提取物三萜类化学成分分析及其抗非酒精性脂肪肝作用研究*

常晓燕¹ 李壮壮¹ 吴嘉硕¹ 金唯一^{1,2} 石 钺^{1Δ}

(1 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193; 2 河北医科大学 河北 石家庄 050017)

摘要 目的:对泽泻汤不同极性溶剂提取物三萜类化学成分进行定性分析并探究其对非酒精性脂肪肝的干预作用。**方法:**制备泽泻汤水及95%乙醇提取物,利用超高效液相色谱串联高分辨质谱技术对三萜类成分进行定性鉴别,并比较两种提取物中三萜类化合物数量及含量差异。采用油酸诱导的HepG2细胞脂肪累积模型评价泽泻汤不同极性提取物干预非酒精性脂肪肝的能力。**结果:**在泽泻汤中共鉴定20个三萜类色谱峰,水提取物中鉴定出14个三萜类成分,其中16-oxo-alisol A相对含量最高,95%乙醇提取物中鉴定出16个三萜类成分,alisol B 23-acetate相对含量最高。两提取物均能显著降低细胞中的脂肪累积量,且乙醇提取物表现出更强的抑制细胞内脂肪累积的作用。**结论:**泽泻汤水及95%乙醇提取物中三萜类化合物数量和含量存在差异,两种提取物均具有潜在抗非酒精性脂肪肝作用,且乙醇提取物活性更强,研究结果为泽泻汤进一步的药效物质基础及药理活性研究提供了基础。

关键词:泽泻汤;三萜;化学成分;脂肪累积;非酒精性脂肪肝

中图分类号:R-33;R575.5;R284 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)01-01-07

Identification of the Triterpenoids in the Extracts of ZeXie Decoction and Investigation of Their Effects on Nonalcoholic Fatty Liver*

CHANG Xiao-yan¹, LI Zhuang-zhuang¹, WU Jia-shuo¹, JIN Wei-yi^{1,2}, SHI Yue^{1Δ}

(1 Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100193, China; 2 Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, 050017, China)

ABSTRACT Objective: To identify the triterpenoids in the extracts of ZeXie Decoction (ZXD) prepared using different polar solvents and investigate their effects on the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods:** Different ZXD extracts were prepared using water and 95% ethanol respectively, and an UPLC-MS/MS method was developed for the qualitative analysis of the triterpenoids in the two extracts. Then, oleic acid induced lipid accumulation model in HepG2 cells was established to evaluate the effects of the two extracts on NAFLD. **Results:** A total of 20 peaks were identified in ZXD, with 14 triterpenoids were detected in water extract and 16 in 95% ethanol extract. 16-Oxo-alisol A and alisol B 23-acetate were triterpenoids showed the highest relative content in the two extracts, respectively. Both tested ZXD extracts resulted in a dose-dependent reduction in intracellular lipid accumulation, with the ethanol extract being superior to the aqueous extract. **Conclusions:** The differences in the quantities and the relative contents of triterpenoids in the water and 95% ethanol extracts were observed. Both extracts had potential therapeutic effect on NAFLD, and the ethanol extract showed stronger activity. These results may be helpful for further research on the effective substance and pharmacological activity of ZXD.

Key words: ZeXie Decoction; Triterpenoids; Chemical constituents; Lipid accumulation; Non-alcoholic fatty liver disease

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R575.5; R284 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)01-01-07

前言

泽泻汤为古代经典名方,出自东汉张仲景《金匮要略》,由泽泻与白术以5:2比例配伍组成,为历代医家治疗痰饮眩晕的效方,现代研究表明泽泻汤具有利水、降血脂、降血压等药理作用,具有较高的临床应用价值^[1,2]。泽泻汤药简效佳,但是关于泽泻汤全方化学成分的研究报道极少。目前仅能通过构成泽泻汤

的单味药成分对泽泻汤化学成分进行推测,认为泽泻三萜类化学成分可能为泽泻汤主要活性成分^[3-5],但具体哪些成分确切存在于泽泻汤中仍是未知的。故本文通过建立系统、有效的超高效液相色谱与质谱联用方法对泽泻汤三萜类化学成分进行全面分析,为泽泻汤的进一步化学与药效研究提供基础。

同时,基于泽泻汤在发挥降血脂过程中表现出的多靶点、多途径调节脂质代谢的活性^[6-8],为探索泽泻汤古方新用,进一

* 基金项目:中国医学科学院创新工程项目(2016-I2M-1-012)

作者简介:常晓燕,女,硕士研究生,主要研究方向:中药药效物质基础,E-mail: changxiaoyan1234@163.com

Δ 通讯作者:石钺,男,博士生导师,研究员,主要研究方向:中药药效物质基础,E-mail: shiyue1029@126.com,电话:010-57833255

(收稿日期:2020-06-23 接受日期:2020-07-18)

步扩大泽泻汤的治疗作用范围,本文利用油酸诱导的脂肪累积模型评价泽泻汤抗非酒精性脂肪肝的药理活性。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器 Ultimate 3000 超高效液相色谱(美国戴安公司)串联 Thermo Q Exactive™ Plus Orbitrap™ 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),德国西门子冰箱(4℃, -20℃),Eppendorf 移液器(德国),TGL16M 冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司)。

1.1.2 材料 药材泽泻 *Alisma orientalis*(批号:DD6081,产地:福建)和白术 *Atractylodes macrocephala*(批号:DD8061,产地:浙江)购自北京华邈中药工程技术中心。对照品泽泻醇 A(Alisol A)、泽泻醇 B(Alisol B)、泽泻醇 C(Alisol C)、24-乙酰泽泻醇 A(Alisol A 24-acetate)、23-乙酰泽泻醇 B(Alisol B 23-acetate)及 23-乙酰泽泻醇 C(Alisol C 23-acetate)购自成都克洛玛生物科技有限公司,上述对照品经 HPLC 检测其纯度均≥98%。色谱纯甲醇和乙腈购买自 Honeywell Burdick & Jackson 公司。人源肝肿瘤细胞株 HepG2 由中国医学科学院药用植物研究所赠与。高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、100×青霉素及油酸购自美国 Gibco 公司。胰蛋白酶-EDTA、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒、尼罗红染液、PBS 购自北京 Solaibao 科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 泽泻汤提取物样品制备 泽泻和白术按 5:2 处方重量比例进行混合,粉碎后,分别加入 10 倍量蒸馏水和 95%乙醇水溶液冷浸 2 h 后,煮沸回流提取 3 次每次 2 h,过滤煎液,合并三次滤液,挥干溶剂,得泽泻汤水及 95%乙醇提取物。分别取泽泻汤水及 95%乙醇提取物 50 mg 溶于 10 mL 50% 甲醇水溶液中,涡旋超声后,12000 rpm 常温离心 10 min,取 2 μL 上清液进行 LC-MS 分析。

1.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品配制浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液,涡旋超声后,常温下 12000 rpm 离心 10 min,取上清作为对照品贮备液。使用时取适量对照品贮备液混合后得对照品溶液。

1.2.3 LC-MS/MS 条件 液相条件:色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)色谱柱,流动相 A:乙腈,流动相 B:0.1% 甲酸水,流速:0.2 mL/min,进样体积:2 μL,自动进样器温度:10℃,样品温度:4℃,柱温:30℃。梯度洗脱条件:0-10 min, 0%-1% A; 10-15 min, 1-3% A; 15-20 min, 3-10% A; 20-25 min, 10%-15% A; 25-30 min, 15-20% A; 30-35 min, 20%-30% A; 35-40 min, 30-60% A; 40-45 min, 60%-80% A; 45-50 min, 80%-90% A; 50-55 min, 90%-100% A。

质谱条件:离子源为 HESI 源,正负离子检测模式,扫描模式:Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70000, dd-MS² 分辨率 17500;扫描范围: m/z 80-1200,喷雾电压:+3000V 和 -2800V;毛细管温度:320℃;保护气体流量:35 L/min;辅助气体流量:10 L/min;阶梯碰撞能量:20、40 和 60 eV。

1.2.4 泽泻汤提取物对细胞活力的影响 HepG2 细胞在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中进行传代培养,收集处于对

数生长期的 HepG2 细胞,按 1×10^4 /孔密度将细胞接种于 96 孔细胞培养板,培养 24 h 使细胞贴壁。弃去旧培养基,加入浓度分别为 10、20、40、80、160、320、640、1280 μg/mL 的泽泻汤水及乙醇提取物培养基溶液,每个浓度设置 6 个复孔。24 h 后弃去培养基,每孔加入 100 μL 10% CCK-8 溶液,将培养板置于培养箱内孵育 1 h。测定 450 nm 处的吸光度值 $A^{490,10}$ 。

细胞活力计算公式:细胞活力(%)=[A(加药)-A(空白)]/[A(对照)-A(空白)]×100

A(空白):含 CCK-8 溶液而无细胞的孔吸光度值

A(对照):含细胞及 CCK-8 溶液而无泽泻汤提取物的孔吸光度值

A(加药):含细胞、CCK-8 溶液和泽泻汤提取物的孔吸光度值

1.2.5 泽泻汤提取物抑制油酸诱导的 HepG2 细胞脂肪累积作用实验 利用 CCK-8 试剂筛选出无细胞毒的油酸造模浓度后,按 1.2.4 项下培养 24 h 使细胞贴壁。24 h 后弃去旧培养基,模型组中加入含油酸培养基,给药组加入含油酸及不同浓度泽泻汤提取物培养基,继续培养 24 h^[11,12]。24 h 后弃去培养基,每孔加入 200 μL PBS 洗涤三遍,每孔加入 100 μL 尼罗红染液,静置 10 min 后,使用全波长酶标仪于激发波长 485 nm,发射波长 572 nm 下测定荧光强度^[13,14]。

1.2.6 数据处理 采用 SPSS 23.0 数据分析软件对实验数据进行处理,实验结果以 Mean ± SE 表示。实验中所得到数据图形均用 GraphPad Prism 8 软件绘制。

2 结果

2.1 UPLC-MS 鉴定泽泻汤三萜类化合物

利用超高效液相色谱串联四级杆-静电轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE)技术在上述液相和质谱条件下,对泽泻汤水及 95%乙醇提取物三萜类化学成分进行定性分析,两提取物正离子模式下的基峰色谱图如图 1 所示。首先对对照品质谱数据进行分析,总结其质谱裂解规律,以辅助鉴定泽泻汤三萜类化学成分。最终,在泽泻汤中共鉴定 20 个三萜类色谱峰,其中,通过与对照品的保留时间和质谱裂解信息对比,明确 μ 识别 4 个色谱峰,通过精确分子量及 MS/MS 多级质谱信息,结合相关文献报道,推导其余 16 个色谱峰的化学结构,详细信息如表 1 所示。此外,如图 2 所示,在泽泻汤水提取物中鉴定出 14 个三萜类成分,95%乙醇提取物中鉴定出 16 个三萜类成分,表明不同极性提取溶剂能影响泽泻汤提取物中三萜类成分的种类和数量。同时,对比两提取物中各三萜类化合物的峰面积百分含量(表 1)可发现,同一化合物在两提取物中的含量存在差异。此外,水提取物中 16-oxo-alisol A 相对含量最高,而 95%乙醇提取物中 alisol B 23-acetate 含量最高。

泽泻汤中的三萜类化学成分结构母核相似,多为原萜烷型四环三萜,质谱裂解规律具有一定的相似性,以色谱峰 13 及 20 为例具体阐述泽泻汤中三萜类化合物鉴定过程。色谱峰 13 ($t_R = 45.53$ min)在质谱分析中产生 m/z 469.3309 的准分子离子峰。该化合物中 C-23 位发生脱水产生 m/z 451.3199 的碎片离子,此外,C-23 发生氢重排导致 C-23 与 C-24 之间的化学键发生断裂,丢失 72 Da 的碎片,产生了二级质谱中丰度最强的

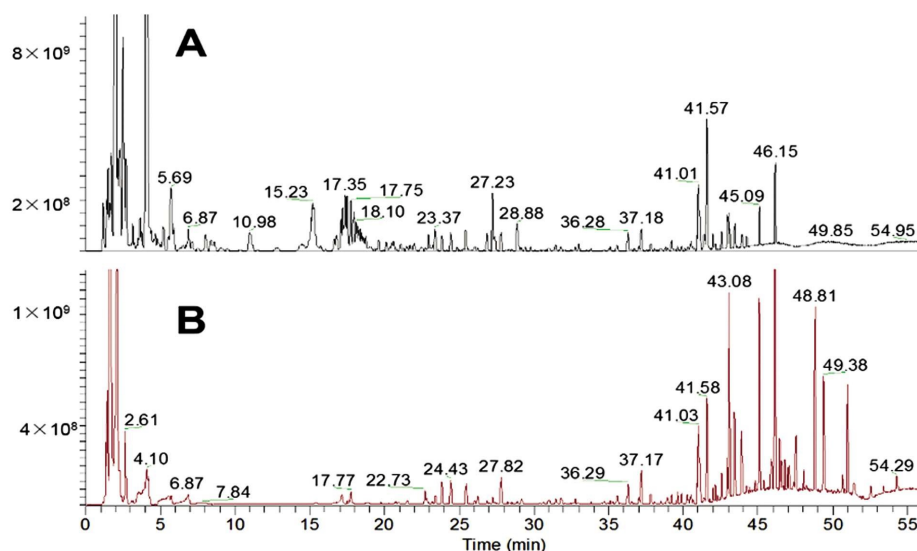


图 1 A: 泽泻汤水提取物基峰色谱图; B: 泽泻汤 95% 乙醇提取物基峰色谱图

Fig. 1 A: Base peak ion chromatograms of ZXD aqueous extract; B: Base peak ion chromatograms of ZXD ethanol extract

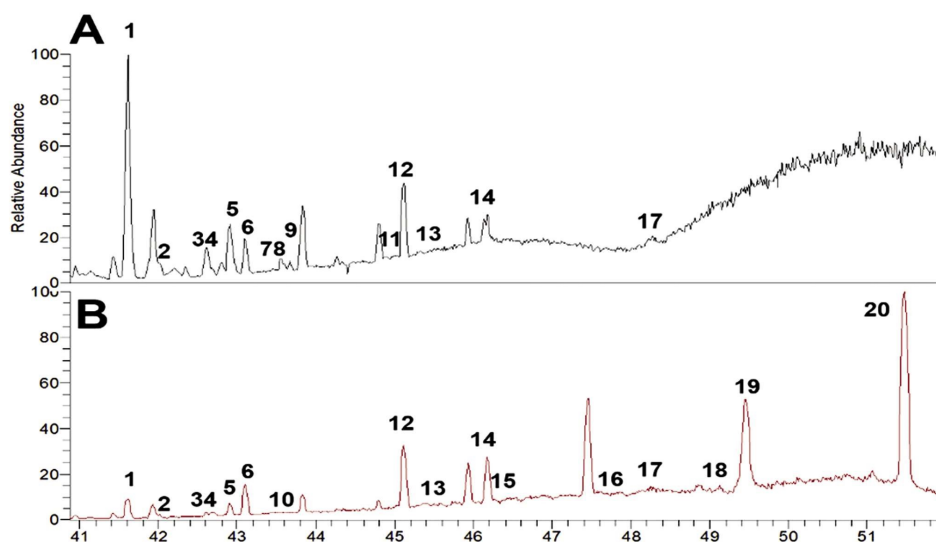


图 2 A: 泽泻汤水提取物三萜类化合物的鉴定; B: 泽泻汤 95% 乙醇提取物三萜类化合物的鉴定

Fig.2 A: Identification of the triterpenes in ZXD aqueous extract; B: Identification of the triterpenes in ZXD ethanol extract

碎片离子 m/z 397.2732。综合分析该化合物的质谱特征信息,并结合相关文献^[16,17],色谱峰 13 最终被鉴定为 alisol L (图 3)。

色谱峰 20 ($t_R = 51.47$ min) 正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 515.3724, 碎片离子峰为 m/z 497.3618 $[M+H-H_2O]^+$ 、479.3512 $[M+H-2H_2O]^+$ 和 437.3400 $[M+H-HAc-H_2O]^+$ 。此外,由于 C-23 位发生乙酰基重排反应导致 C-23 与 C-24 之间化学键的断裂,以及 C-11 丢失一分子 H_2O 而产生该化合物特征碎片离子 m/z 383.2944 $[M+H-2H_2O-C_6H_{10}O_2]^+$ 。在化合物鉴定过程中,该碎片离子可用于辅助该类型三萜类化合物的鉴定。通过与对照品质谱数据进行比对,色谱峰 20 被准确鉴定为 alisol B 23-acetate,推导其质谱裂解方式如图 4 所示。

2.2 泽泻汤不同极性溶剂提取物体外抗非酒精性脂肪肝作用

2.2.1 泽泻汤不同溶剂提取物对细胞活力的影响 将系列浓度的泽泻汤水及 95% 乙醇提取物作用于 HepG2 细胞 24 h 后,以 CCK-8 试剂检测其细胞毒性,结果显示泽泻汤水提取物浓度

低于 $640 \mu\text{g/mL}$ 时, HepG2 细胞的存活率均在 90% 以上,泽泻汤乙醇提取物浓度在 $320 \mu\text{g/mL}$ 以下时, HepG2 细胞的存活率均在 90% 以上,表明该浓度下,泽泻汤不同极性提取物对 HepG2 细胞无明显细胞毒性。综合考虑细胞毒性以及初步探索泽泻汤药效活性的实验目的,选择浓度为 160、80、40 $\mu\text{g/mL}$ (图 5) 的泽泻汤不同极性提取物进行进一步的药效实验。

2.2.2 泽泻汤不同极性溶剂提取物抑制油酸诱导的 HepG2 细胞脂肪累积作用 CCK-8 试剂检测油酸造模浓度为 0.2 mmol/L 时,细胞存活率在 90% 以上,在显微镜下观察,细胞形态正常,说明油酸浓度在 0.2 mmol/L 及以下浓度对 HepG2 细胞没有明显损伤。故将油酸造模浓度确定为 0.2 mmol/L。

利用 0.2 mmol/L 油酸造模,不同浓度泽泻汤水提取物及 95% 乙醇提取物进行干预后,使用尼罗红染液对细胞内累积的脂滴进行染色,通过检测细胞的荧光强度来评价泽泻汤不同极性提取物抑制 HepG2 细胞脂肪累积的能力。由图 6 可以看出,

表 1 泽泻汤水及 95%乙醇提取物三萜类化合物 UPLC-MS 鉴定

Table 1 Characterization of the triterpenes in ZXD water and 95% ethanol extracts by UPLC- MS

Peak Number	t_R (min)	Mean Measured Mass (Da)	Theoretical Exact Mass (Da)	Error (ppm)	Molecular Formula	Fragment Ions Collected in Positive Mode	Identification	Percentage in WE(%)	Percentage In 95% EE (%)
1	41.61	505.3513	505.3524	-2.1	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	487.3409,469.3306,451.3199,415.2834,397.2732,353.2467	16-Oxo-alisol A ^[15,16]	1.34	0.60
2	42.00	547.3623	547.3629	-1.2	C ₃₂ H ₅₀ O ₇	529.3519,511.3401,469.3304,451.3201,415.2834,397.2744,353.2465	16-Oxo-alisol A 23-acetate ^[15,16]	0.44	0.55
3	42.60	487.3412	487.3418	-1.2	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	469.3306,451.3208,433.3094,415.2834,397.2729,353.2470,329.2092	16-Oxo-11-anhydro-alisol A ^[15,17]	0.17	0.35
4	42.61	529.3516	529.3524	-1.4	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	511.3432,469.3307,451.3199,433.3095,415.2837,379.2625,353.2456	Alismaketone-C 23-acetate ^[16,18]	0.17	0.35
5	42.99	471.3464	471.3469	-1.0	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3354,435.3239,381.2783,363.2679,337.2519	16,23-Oxido-alisol B ^[16]	0.36	0.39
6	43.10	487.3411	487.3418	-1.4	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	469.3311,451.3201,433.3107,415.2836,397.2728,353.2474	Alisol Ca	0.17	0.82
7	43.46	545.3468	545.3473	-0.9	C ₃₂ H ₄₈ O ₇	527.3378,509.3287,485.3240,467.3165,449.3036,427.2844	Alisol M 23-acetate ^[17,18]	0.13	--
8	43.56	487.3414	487.3418	-0.8	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	469.3323,451.3200,433.3105,415.2849,399.2888,379.2628,353.2477	Alisol C isomers ^[19]	0.13	--
9	43.59	489.3569	489.3575	-1.1	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	471.3469,453.3357,435.3267,399.2888,381.2782,355.2628	Alisol F ^[15-19]	0.13	--
10	43.63	545.3463	545.3473	-1.8	C ₃₂ H ₄₈ O ₇	527.3360,509.3285,485.3249,467.3149,449.3040	Alisol M 23-acetate ^[16,19]	--	0.07
11	44.98	471.3463	471.3469	-1.2	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	453.3357,399.2885,381.2770,355.2639,339.2686	11-Deoxy-alisol C ^[15]	0.29	--
12	45.11	529.3516	529.3524	-1.4	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	511.3412,469.3299,451.3197,433.3101,415.2841,381.2798,353.2500,297.2130	Alisol C 23-acetate	0.38	1.94
13	45.53	469.3309	469.3312	-0.7	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	451.3199,397.2732,353.2473,335.2368	Alisol L ^[16,17]	0.02	0.10
14	46.17	473.3618	473.3625	-1.6	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	455.3503,437.3414,381.2941,365.2831,339.2675	Alisol Ba	0.29	1.48

续表 1 泽泻汤水及 95%乙醇提取物三萜类化合物 UPLC-MS 鉴定

Table 1 Characterization of the triterpenes in ZXD water and 95% ethanol extracts by UPLC- MS

Peak Number	t_R (min)	Mean Measured Mass (Da)	Theoretical Exact Mass (Da)	Error (ppm)	Molecular Formula	Fragment Ions Collected in Positive Mode	Identification	Percentage in WE(%)	Percentage In 95% EE (%)
15	46.30	511.3409	511.3418	-1.8	$C_{30}H_{44}O_4$	493.3316, 469.3304, 451.3195, 433.3090, 397.2733, 379.2631	Alisol L 23-acetate ^[16,19]	--	0.36
16	47.83	531.3706	531.3680	4.9	$C_{32}H_{50}O_6$	513.3578, 495.3476, 451.3363, 435.3241, 371.2788, 355.2628, 337.2521	Alisol F 24-acetate ^[16,17]	--	0.22
17	48.35	513.3571	513.3575	-0.7	$C_{32}H_{48}O_5$	495.3447, 478.3300, 451.3355, 435.3255, 399.2892	Alisol O ^[17,19]	0.09	0.45
18	49.19	531.3707	531.3680	5.1	$C_{32}H_{50}O_6$	513.3588, 495.3468, 451.3349, 435.3261, 399.2895, 371.2784, 363.2689	13,17-Epoxy-alisol B 23-acetate ^[15]	--	0.24
19	49.45	455.3511	455.3520	-1.9	$C_{30}H_{46}O_3$	437.3417, 419.3320, 381.3295, 365.3285, 339.2672, 321.2590, 297.2504	Alisol I ^[15,16]	--	4.28
20	51.47	515.3724	515.3731	-1.2	$C_{32}H_{50}O_5$	497.3618, 479.3512, 451.3566, 437.3400, 419.3293, 383.2944, 365.2810, 357.2791, 339.2675	Alisol B 23-acetate ^a	--	9.77

Note: ^aCompared with the reference compounds; WE indicated the water extract and 95% EE was 95% ethanol extract; "--" indicated the compounds were not detected in the extracts.

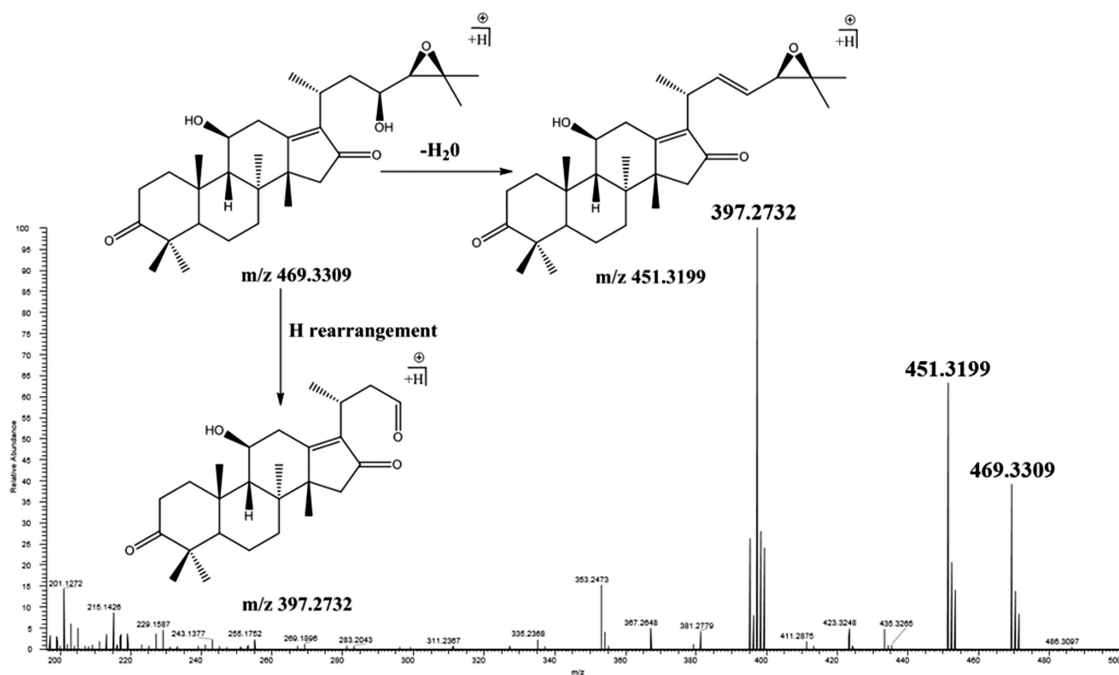


图 3 化合物 alisol L 的质谱碎裂途径推导

Fig. 3 The proposed fragmentation pathway of alisol L

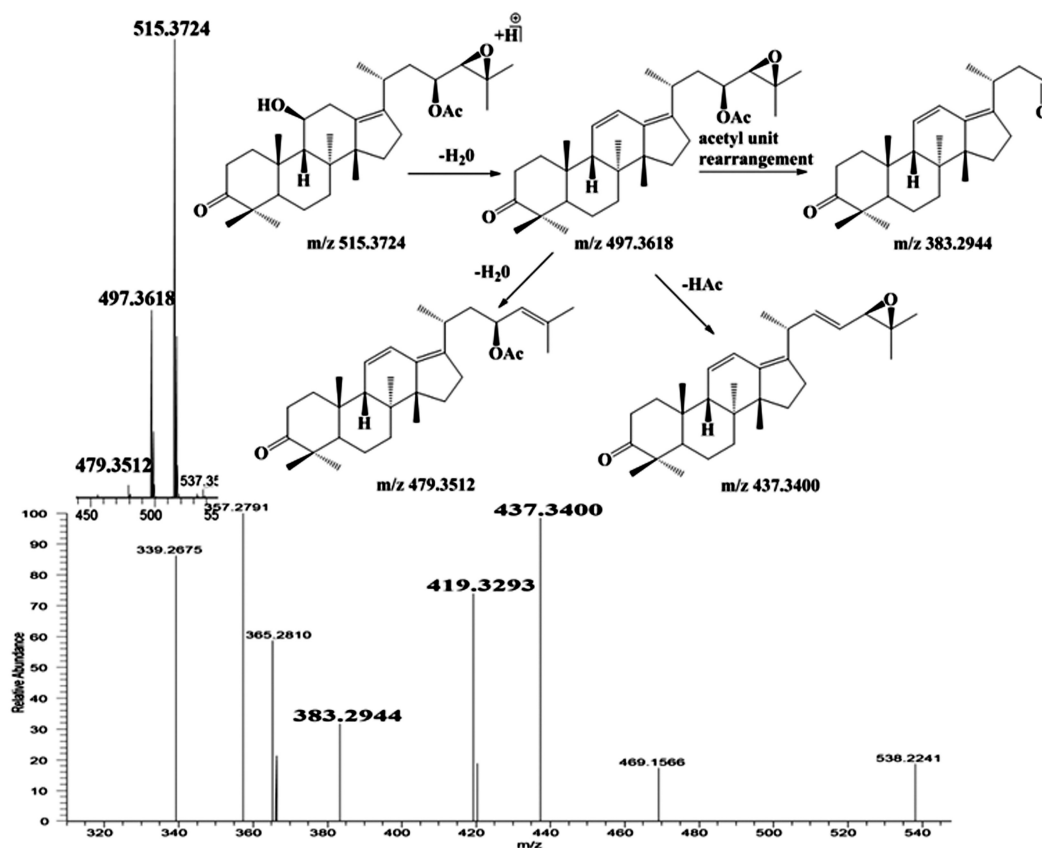


图4 化合物 alisol B 23-acetate 的质谱碎裂途径推导

Fig. 4 The proposed fragmentation pathway of alisol B 23-acetate

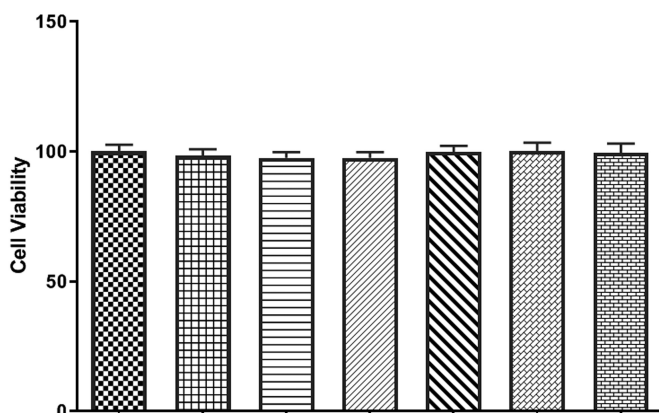


图5 泽泻汤提取物对 HepG2 细胞的细胞毒性

注: W-H、W-M、W-L 分别表示水提取物给药浓度为 160、80、40 $\mu\text{g/mL}$;
E-H、E-M、E-L 分别表示 95%乙醇提取物给药浓度为 160、80、40 $\mu\text{g/mL}$ 。

Fig.5 Cytotoxicity of ZXD extracts on HepG2 cells

Note: W-H, W-M, W-L indicated the concentrations of the water extract were 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$ respectively; E-H, E-M, E-L indicated the concentrations of the 95% ethanol extract were 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$ respectively.

与对照组相比, 模型组细胞中的脂质含量明显升高 ($P < 0.01$), 表明模型造模成功, 同时, 泽泻汤水提取物在浓度为 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 能极显著的降低细胞内的脂肪累积量 ($P < 0.01$), 95%乙醇提取物在浓度为 40、80 和 160 $\mu\text{g/mL}$ 时, 均能极显著的降低细胞内的脂肪累积量 ($P < 0.01$), 表明两提取物均具有潜在抗非酒精性脂肪肝作用。并且, 两提取物的抑制效果均表现出剂量依赖

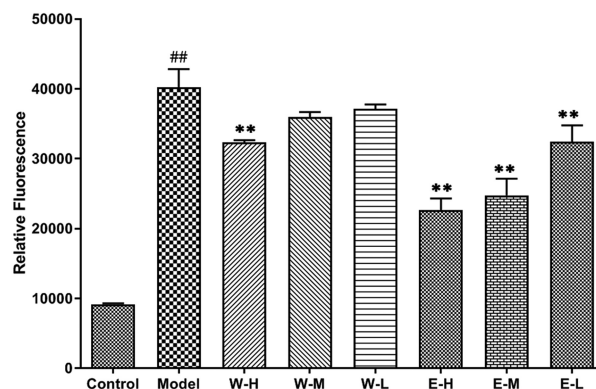


图6 泽泻汤体外抗非酒精性脂肪肝作用

注: W-H、W-M、W-L 分别表示水提取物给药浓度为 160、80、40 $\mu\text{g/mL}$;
E-H、E-M、E-L 分别表示 95%乙醇提取物给药浓度为 160、80、40 $\mu\text{g/mL}$ 。
与对照组相比 $^{\#}P < 0.01$; 与模型组相比 $^{**}P < 0.01$ 。

Fig.6 Effects of ZXD extracts on lipid accumulation in HepG2 cells

Note: W-H, W-M, W-L respectively indicated the concentrations of the water extract were 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$ respectively; E-H, E-M, E-L respectively indicated the concentrations of the 95% ethanol extract were 160, 80, 40 $\mu\text{g/mL}$ respectively; Compared with control group $^{\#}P < 0.01$; Compared with model group $^{**}P < 0.01$.

性。此外, 95%乙醇提取物表现出更强的抑制细胞内脂肪累积的作用。

3 讨论

三萜类是泽泻中含量最多且药理活性报道最多的化合物, 目前, 泽泻三萜类化合物已被报道具有利尿、降血脂、保肝、抗

炎、抗氧化等活性^[20-22]。泽泻作为泽泻汤君药,其含有的三萜类化合物对泽泻汤的药理活性具有重要意义。此外,臣药白术也被报道含有三萜类成分^[23]。因此,对泽泻汤三萜类化学成分进行分析,阐明其主要化学物质基础,有利于泽泻汤进一步的药理活性及作用机制研究。以往对泽泻汤三萜类化学成分的研究较少,已报道的文献多使用液相色谱对三萜类成分进行分析,报导化合物以 alisol A、alisol B、alisol B 23-acetate 等含量较高的成分为主^[24-26]。对于某些低含量或紫外吸收较弱的三萜类成分,受到检测灵敏度的限制,利用液相色谱难以检出。本文首次利用超高效液相色谱串联高分辨质谱技术对泽泻汤三萜类化合物进行分析,该方法灵敏度高,且能依据多级质谱信息对三萜类成分进行鉴别,有利于三萜类成分更全面、准确的鉴定。本次鉴定出的 16-oxo-alisol A、16-oxo-alisol A 23-acetate、16-oxo-11-anhydro-alisol A、Alismaketone-C 23-acetate、16,23-oxido-alisol B 等成分均为首次在泽泻汤中被鉴定出,为泽泻汤化学成分研究提供了新的物质信息。此外,本研究发现利用超高效液相色谱对泽泻汤提取物中三萜类成分进行色谱分析时,三萜类成分主要聚集于分析时间的后 10 分钟内,且鉴定出的三萜类成分均来自泽泻,白术中的三萜类成分未被检测到,可能由于含量过低导致。在后续的工作可继续优化色谱条件,获得更好的分离度,确保低含量成分的检出。在此基础上,对泽泻汤其他类型化学成分进行分析,进一步完善泽泻汤物质基础,为深入研究泽泻汤提供必要信息。

水煎剂常作为泽泻汤临床用药形式,但是有报道显示泽泻汤不同极性部位具有不同的药理活性^[27],本试验通过对泽泻汤水及乙醇提取物三萜类化学成分进行分析,发现两提取物中三萜类化合物的种类和含量存在较大差异,可从化学成分的角度初步解释泽泻汤不同极性提取物活性差异的原因,同时为泽泻汤不同极性溶剂提取物的应用提供必要的物质基础。

此外,前期泽泻汤药效活性研究主要集中于利水、降血压、降血脂等方面,泽泻汤抗非酒精性脂肪肝作用的探索处于初级阶段^[28-30]。在泽泻汤调节脂质代谢的基础上,本试验利用油酸诱导的 HepG2 细胞脂肪累积模型初步评价了泽泻汤水及乙醇提取物体外抗非酒精性脂肪肝的作用,两种提取物均表现出潜在抗非酒精性脂肪肝作用,且乙醇提取物表现出更强的抑制作用。非酒精性脂肪肝作为威胁我国居民健康的第一大慢性肝病^[31],目前并没有针对该病的特效西药,中医药在治疗非酒精性脂肪肝的过程中表现出独特优势,在非酒精性脂肪肝的治疗中具有广阔的应用前景^[32,33]。在后续工作中应将泽泻汤应用于非酒精性脂肪肝动物模型中,进一步确证其治疗作用,并探究其作用机制,为非酒精性脂肪肝提供新的治疗药物。

综上所述,本文利用超高效液相色谱与高分辨质谱联用技术对泽泻汤三萜类化学成分进行了分析,对泽泻汤的质量控制及深入研究具有重要参考意义。论文还初步探究了泽泻汤对非酒精性脂肪肝的治疗作用,对泽泻汤的古方新用及非酒精性脂肪肝的治疗均具有重要意义。

参考文献(References)

- [1] 谭峰,陈学习,阮时宝.《金匱要略》泽泻汤研究概况[J]. 中华中医药学刊, 2007(10): 2039-2041
- [2] 李莎莎,钟利群,夏梦幻. 泽泻汤的相关研究概况[J]. 现代中医临床,

2017, 24(04): 56-60

- [3] Zhang X, Li X Y, Lin N, et al. Diuretic activity of compatible triterpene components of *Alismatis rhizoma* [J]. Molecules, 2017, 22 (9): 1459-1471
- [4] Xu F, Yu H, Lu C, et al. The cholesterol-lowering effect of alisol acetates based on HMG-CoA reductase and its molecular mechanism [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 4753852
- [5] Lin H R. Triterpenes from *Alisma orientalis* act as androgen receptor agonists, progesterone receptor antagonists, and glucocorticoid receptor antagonists[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24(15): 3626-3632
- [6] 徐小妹,林文津,张亚敏,等. 泽泻汤降脂作用与肠道微生物的相关性探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(03): 116-121
- [7] 徐小妹,林文津,张亚敏,等. 泽泻汤对高脂血症大鼠肝脏线粒体蛋白质的影响[J]. 福建医药杂志, 2016, 38(03): 53-57
- [8] Song C, Huang X, Lu K, et al. The rationality of the hypolipidemic effect of *Alismatis Rhizoma* Decoction, a classical chinese medicine formula in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice [J]. Iran J Pharm Res, 2014, 13(2): 641-649
- [9] Cai Y, Cui W L, Chen W X, et al. The effects of a histone deacetylase inhibitor on biological behavior of diffuse large B-cell lymphoma cell lines and insights into the underlying mechanisms[J]. Cancer Cell Int, 2013, 13: 57-65
- [10] 张晓霞,韩丽,孙晶,等. 新疆芹菜根提取物抑制 HepG2 细胞体外脂肪堆积的实验研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2019, 42(06): 808-812
- [11] 刘畅,张海华,柴洋洋,等. 红树莓提取物降低油酸诱导 HepG2 细胞脂肪的积累[J]. 现代食品科技, 2019, 35(02): 24-31
- [12] Cao P, Huang G, Yang Q, et al. The effect of chitooligosaccharides on oleic acid-induced lipid accumulation in HepG2 cells [J]. Saudi Pharm J, 2016, 24(3): 292-298
- [13] Su R C, Lad A, Breidenbach J D, et al. Hyperglycemia induces key genetic and phenotypic changes in human liver epithelial HepG2 cells which parallel the Leprdb/J mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. PLoS One, 2019, 14(12): e0225604
- [14] Jeong H S, Cho Y H, Kim K H, et al. Anti-lipoapoptotic effects of *Alisma orientalis* extract on non-esterified fatty acid-induced HepG2 cells[J]. BMC Complement Altern Med, 2016, 16: 239-249
- [15] Zhao W, Huang X, Li X, et al. Qualitative and quantitative analysis of major triterpenoids in *Alismatis Rhizoma* by high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. Molecules, 2015, 20 (8): 13958-13981
- [16] Liu X, Li S L, Zhou Y, et al. Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Sp, 2010, 24(11): 1514-1522
- [17] 邓岳,刘阿娜,王小明,等. HPLC-TOF-MS 分析泽泻提取物中三萜类化合物[J]. 化学分析计量, 2015, 24(06): 11-14
- [18] Chen L L, Hu Z F, Ding X P, et al. Identification and determination of the major triterpenes in *Rhizoma Alismatis* by HPLC-evaporative light scattering detection and HPLC/electrospray ionization-MS [J]. J Aoac Int, 2013, 96(2): 260-264

(下转第 12 页)

- and disease[J]. *Physiol Rev*, 1992, 72(4): 1063-1081
- [5] J Kim, SW Jang, E Park, et al. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 72: 157-167
- [6] J Madrigal-Matute, CE Fernandez-Garcia, C Gomez-Guerrero, et al. HSP90 inhibition by 17-DMAG attenuates oxidative stress in experimental atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(1): 116-123
- [7] 吴峰, 冯金忠, 李松华, 等. 热休克蛋白 90 对血小板源衍生因子诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2014, (31): 6062-6064
- [8] 唐杨峰, 张锡武, 谈梦伟, 等. 胸主动脉夹层血管平滑肌细胞的表型转化研究[J]. *中国血管外科杂志(电子版)*, 2013, (02): 116-118
- [9] EM Maguire, Q Xiao, Q Xu. Differentiation and Application of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Vascular Smooth Muscle Cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(11): 2026-2037
- [10] A Frisantiene, M Philippova, P Erne, et al. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity[J]. *Cell Signal*, 2018, 52: 48-64
- [11] A Hoter, ME El-Sabban, HY Naim. The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2560
- [12] FH Schopf, MM Biebl, J Buchner. The HSP90 chaperone machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 345-360
- [13] J Zhang, L Wang, W Fu, et al. Smooth muscle cell phenotypic diversity between dissected and unaffected thoracic aortic media[J]. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2013, 54(4): 511-521
- [14] J Qi, P Yang, B Yi, et al. Heat shock protein 90 inhibition by 17-DMAG attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(8): H841-852
- [15] O Boucherat, T Peterlini, A Bourgeois, et al. Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2018, 198(1): 90-103
- [16] 陶沙, 谭宁, 冯颖青. Molecular mechanisms and therapeutic perspectives of left ventricular hypertrophy in systemic hypertension [J]. *South China Journal of Cardiology*, 2015, (04): 256-261
- [17] 蒋静, 刘登辉, 吴晓丽. HSP90 基因表达情况与妊娠期高血压疾病中发生发展相关性分析及其临床意义 [J]. *中国妇幼保健*, 2018, (13): 3060-3063
- [18] 艾建华, 杨镇. 热休克蛋白 90 在门静脉高压大鼠肠系膜血管中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, (02): 97-98
- [19] 赵永波, 岳月红, 王彦芝, 等. 急性 Stanford A 型主动脉夹层患者的临床特征及术后院内死亡危险因素分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2019, (07): 1362-1366
- [20] DM Milewicz, DC Guo, V Tran-Fadulu, et al. Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2008, 9: 283-302
- [21] H Hao, G Gabbiani, ML Bochaton-Piallat. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(9): 1510-1520
- [22] 万幼峰, 刘涛, 郭春华, 等. 抑制热休克蛋白 90 活性对 HepG2 细胞迁移的影响和相关机制[J]. *现代肿瘤医学*, 2018(19): 2999-3003
- [23] GJ Koullias, P Ravichandran, DP Korkolis, et al. Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78(6): 2106-2110; discussion 2110-2101
-
- (上接第 7 页)
- [19] Li S, Jin S, Song C, et al. The strategy for establishment of the multiple reaction monitoring based characteristic chemical profile of triterpenes in *Alismatis rhizoma* using two combined tandem mass spectrometers [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1524: 121-134
- [20] Shu Z, Pu J, Chen L, et al. *Alisma orientale*: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(2): 227-251
- [21] Li Q, Qu H. Study on the hypoglycemic activities and metabolism of alcohol extract of *Alismatis Rhizoma*[J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(6): 1046-1053
- [22] Feng Y L, Chen H, Tian T, et al. Diuretic and anti-diuretic activities of the ethanol and aqueous extracts of *Alismatis rhizoma* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(2): 386-390
- [23] Zhu B, Zhang Q L, Hua J W, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Atractylodes macrocephala* Koidz: A review[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 226(226): 143-167
- [24] 曹宁宁, 杨文静, 林映仙, 等. 经典名方泽泻汤的 HPLC 指纹图谱及多指标含量测定研究[J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2773-2780
- [25] 胡诚, 陈龙, 蒋元烨, 等. HPLC 法测定泽泻汤中泽泻醇 A、泽泻醇 B 和 23- 乙酰泽泻醇 B 含量 [J]. *上海中医药大学学报*, 2019, 33(05): 73-77
- [26] 伍蕊嗣, 姚运秀, 刘钱, 等. 不同干燥方式泽泻汤指纹图谱的建立及 2 种成分测定[J]. *中成药*, 2019, 41(08): 1905-1910
- [27] 黄晓飞, 周蕾, 彭晓辉, 等. 泽泻汤及其乙醇部位对高血症大鼠血脂及血脂代谢相关酶的影响 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2013, 15(06): 3-6
- [28] 宋冬佳, 杨阳, 徐京育. 李廷应用泽泻汤合温胆汤治疗舒张压高的临床经验[J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(04): 624-626+657
- [29] 袁莉莉, 王倩. 基于网络药理学研究泽泻汤治疗脑水肿的作用机制[J]. *长春中医药大学学报*, 2019, 35(05): 912-915
- [30] 李爱珍. 泽泻汤治疗高脂血症的临床疗效 [J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(36): 114-115
- [31] Zhu J Z, Zhou Q Y, Wang Y M, et al. Prevalence of fatty liver disease and the economy in China: A systematic review [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21: 5695-5706
- [32] Elhence A, Shalimar. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease- Current perspectives [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2020, 39(1): 22-31
- [33] 赵红, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病的中西医结合治疗现状[J]. *中国临床医生杂志*, 2020, 48(01): 16-18